

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



CARACTERIZACIÓN DEL CASETE CROMOSÓMICO
ESTAFILOCÓCICO *mec* (SCC*mec*) DE
Staphylococcus hominis

POR:
Q.C.B. SORAYA SARAHÍ MENDOZA OLAZARÁN

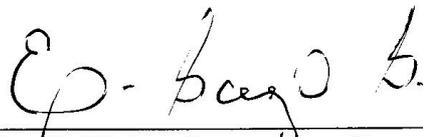
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA

MONTERREY, N.L.

JULIO, 2012

**“Caracterización del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) de
Staphylococcus hominis”**

Aprobación de la Tesis:



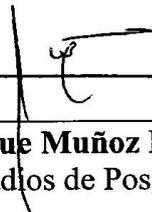
Dr. C. Elvira Garza González
Director de Tesis



Dr. C. Gloria Ma. González González
Co-director de Tesis



M.S.P. Jorge Marín Llaca Díaz
Co-director de Tesis

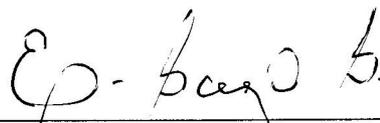


Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

“CARACTERIZACIÓN DEL CASETE CROMOSÓMICO
ESTAFILOCÓCICO *mec* DE *S. hominis*”

Presentado por: Q.C.B. Soraya Sarahí Mendoza Olazarán

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología y Microbiología Molecular, ambos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. C. Elvira Garza González.



Dr. C. Elvira Garza González
Director de Tesis /

DEDICATORIA

A Dios y a mi madre

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Elvira Garza González, asesor de mi tesis por creer en mí, por ser un guía ejemplar, por su dedicación, paciencia y por enseñarme aún más de lo contenido en este proyecto; así como a la Dra. Gloria Ma. González González y al M.S.P. Jorge Martín Llaca, co-directores de mi tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A mi familia y amigos por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades y antecedentes históricos de <i>Staphylococcus hominis</i>	1
1.2 Características microbiológicas y habitat de <i>S. hominis</i>	2
1.3 Factores de virulencia de <i>S. hominis</i>	2
1.4 Epidemiología y espectro clínico de las infecciones causadas por <i>S. hominis</i>	3
1.5 Factores de riesgo asociados a infecciones causadas por <i>S. hominis</i>	4
1.6 Identificación de <i>S. hominis</i>	5
1.7 Resistencia a los antibióticos y el Casete Cromosómico Estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>)	7
1.7.1 Mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos por la proteína PBP2a	8
1.7.2 Estructura básica del SCC <i>mec</i>	9
1.7.3 Complejo de genes <i>mec</i>	10
1.7.4 Complejo de genes <i>ccr</i>	12
1.7.5 Regiones de unión (J)	13
1.7.6 SCC No- <i>mec</i>	14
1.7.7 Tipificación del SCC <i>mec</i>	17
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. OBJETIVOS	19

4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1 Estrategia general	20
4.2 Aislamientos clínicos	21
4.3 Identificación bioquímica	21
4.3.1 API Staph	23
4.4 Identificación molecular	23
4.4.1 Obtención DNA bacteriano por lisis térmica	23
4.4.2 Amplificación del gen 16S rRNA	24
4.4.3 Amplificación del gen <i>tuf</i>	25
4.4.4 Purificación de productos de PCR: método de precipitación con etanol	27
4.5 Determinación de clonas: electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP)	31
4.6 Determinación del fenotipo de resistencia a los antibióticos	31
4.6.1 Prueba de susceptibilidad a meticilina: difusión en disco con cefoxitina	32
4.6.2 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos: microdilución en caldo	34
4.7 Tipificación del SCC <i>mec</i>	34
4.7.1 Método de Zhang y cols.	35
4.7.2 Método de Kondo y cols.	40
4.8 Elucidación de la estructura teórica del nuevo SCC <i>mec</i> de <i>S. hominis</i>	41
5. RESULTADOS	41
5.1 Identificación bioquímica y molecular	42
5.2 Caracterización de <i>S. hominis</i> por EGCP	43
5.3 Fenotipo de resistencia de <i>S. hominis</i>	44

5.4 Tipificación del SCCmec de <i>S. hominis</i>	46
5.5 Elucidación teórica de la estructura de SCCmec de <i>S. hominis</i>	49
6. DISCUSIÓN	57
7. CONCLUSIONES	41
8. REFERENCIAS	
APÉNDICES	64
APÉNDICE A. Pruebas primarias para la identificación de <i>S. hominis</i>	66
APÉNDICE B. Preparación de reactivos y soluciones	

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tipos de SCCmec descritos para <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2. Estudios que incluyeron aislamientos clínicos de <i>S. hominis</i> para la tipificación del SCCmec por metodologías sugeridas para <i>S. aureus</i>	15
3. Iniciadores empleados en la tipificación del SCCmec por el método de Zhang y cols.	37
4. Iniciadores empleados en la tipificación del SCCmec por el método de Kondo y cols.	38
5. Genes de resistencia localizados en elementos móviles dentro del SCCmec	40
6. Resultados de la identificación de los aislamientos ECN	41
7. Resultados de la determinación de resistencia a oxacilina y perfil de resistencia a los antibióticos	43
8. Concentración mínima inhibitoria y porcentaje de resistencia de cada antibióticos evaluado por el método de microdilución en caldo para los 22 aislamientos	44
9. Resultados de la tipificación molecular del SCCmec	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Características básicas de la estructura del SCC <i>mec</i>	9
2. Clases de complejos <i>mec</i> descritos para <i>S. aureus</i> . <i>mecI</i> codifica un represor, <i>mecRI</i> codifica un inductor. Las flechas indican la dirección de la transcripción	11
3. Representación de la homología entre los genes <i>ccr</i> y sus alotipos en <i>S. aureus</i>	12
4. Esquema de la estrategia general experimental	20
5. Esquema de colores para la interpretación de las pruebas bioquímicas	22
6. Esquema de la distribución de los antibióticos y las concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) utilizadas en la placa de microtitulación	34
7. Resultado de la determinación de clonas por EGCP	42
8. Estructuras teóricas de un nuevo SCC <i>mec</i> de <i>S. hominis</i>	48

NOMENCLATURA

CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cols.	Colaboradores
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilendiaminotetracetato
g	Gramos
h	Horas
Kb	Kilobases
L	Litros
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Concentración milimolar
nm	Nanométros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pMol	Concentración en picomoles
s	Segundos
UV	Ultravioleta
v	v Voltios
µg	Microgramos
µL	Microlitros

RESUMEN

Q.C.B. Soraya S. Mendoza Olazarán

Fecha de Graduación: Julio, 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título: “CARACTERIZACIÓN DEL CASETE CROMOSÓMICO ESTAFILOCÓCICO *mec* (SCC*mec*) DE *Staphylococcus hominis*”

Número de páginas: 67

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología Médica.

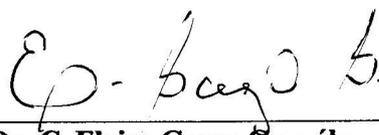
Área de estudio: Microbiología Médica.

Objetivos: Identificar por métodos bioquímicos y moleculares aislamientos clínicos de *S. hominis*. Caracterizar la resistencia metilina y otros antibióticos, relación genética entre los aislamientos y tipo de Casete Cromosómico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) y elucidar de manera teórica la estructura de un nuevo SCC*mec* de *S. hominis*.

Material y Métodos: Se incluyeron 22 aislamientos de origen clínico. La identificación de *S. hominis* se llevó a cabo por métodos bioquímicos y moleculares. La susceptibilidad a los antibióticos se evaluó por método de microdilución en caldo. La resistencia a metilina se determinó mediante disco de cefoxitina y por detección del gen *mecA* por PCR. La relación genética se evaluó por electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP). El tipo de SCC*mec* se determinó por PCR múltiple usando dos metodologías descritas para *Staphylococcus aureus*. En base a los resultados de fenotipo de resistencia y tipo de casete se determinó la estructura teórica del casete de tres aislamientos seleccionados como candidatos a un nuevo SCC*mec*.

Resultados: Los aislamientos mostraron resistencia alta a ampicilina, eritromicina y trimetoprim (>71%). El 81.8% (18/22) de los aislamientos presentaron resistencia a metilina y presencia del gen *mecA*. La EGCP reveló 22 patrones diferentes con homología entre 0 y 95%. Sólo un aislamiento presentó SCC*mec* tipo III con estructura correspondiente a la descrita para *S. aureus*. Dos aislamientos amplificaron SCC*mec* III, *mec* complejo A, *ccrABI*; dos SCC*mec* III, *mec* complejo A, *ccrCI*; cinco SCC*mec* III, *mec* complejo A, *ccrABI* + *ccrCI*.

Conclusiones: Los aislamientos analizados mostraron alta resistencia a metilina y otros antimicrobianos y baja clonalidad. Los resultados sugieren que *S. hominis* podría ser reservorio de *ccrABI*, *ccrCI* y *mec* complejo A para ensamblaje de un SCC*mec* diferente a los descritos para *S. aureus*. Se propone la estructura de 3 nuevos SCC*mec* para *S. hominis*, los cuales presentan entre 62.5% y 75% de elementos descritos para el casete tipo III de *S. aureus*.



Dr. C. Elvira Garza González
Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades y antecedentes históricos de *Staphylococcus hominis*

Staphylococcus hominis es una bacteria de relevancia clínica a nivel nosocomial que se encuentra clasificada dentro del grupo de los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN), el cual incluye actualmente más de 40 especies; sin embargo sólo algunas tienen importancia médica, entre las cuales se encuentran principalmente *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *S. hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus warneri* (1-3).

S. hominis fue descrito por primera vez en 1975 por Kloos, W. E. y Schleifer K. H. tras algunos trabajos de investigación sobre la flora microbiana en piel de humanos (4). En la siguiente década, estos mismos investigadores reportaron a *S. hominis* como la segunda especie de ECN más abundante en la piel de humanos sanos, precedido sólo por *Staphylococcus epidermidis* (5). En 1998, se describieron dos subespecies para este microorganismo: *S. hominis* subsp. *hominis* y *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, y la evidencia mostró una mayor resistencia a los antibióticos en *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (6).

1.2 Características microbiológicas y hábitat de *S. hominis*

Al igual que todos los ECN, *S. hominis* son cocos Gram positivos de aproximadamente 1.3 μm de diámetro, son catalasa positivos, oxidasa negativos y coagulasa negativos. Para su cultivo no se requieren de nutrientes especiales, crece bien en agar sangre, forma colonias circulares, cremosas, blanquecinas, de bordes regulares y de textura lisa, generalmente de 1-2 mm de diámetro, tras una incubación de 24 h a 37°C (1, 4).

S. hominis forma parte de la flora normal de piel y mucosas de humanos y de algunos animales y se ha calculado que en conjunto con las demás especies de ECN, la cantidad de estos microorganismos en humanos sanos puede llegar hasta las 100,000 UFC/cm² (2). De manera particular, esta especie habita principalmente en la región axilar, inguinal y perianal (5, 6).

1.3 Factores de virulencia de *S. hominis*

En la literatura no se cuenta con reportes de estudios sobre los factores de virulencia de esta especie; sin embargo, existen trabajos donde se investigaron dichos factores, de manera conjunta entre las especies de los ECN, en los que se determinó que este grupo de microorganismos es capaz de producir: lipasas, toxinas-delta y proteasas, las cuales contribuyen a la colonización, lesión y destrucción de los tejidos del hospedero respectivamente; enzima modificadora de ácidos grasos que inactiva los ácidos grasos que se encuentran en la piel; ácido poli-D-glutámico que permite la evasión de la respuesta primaria del sistema inmunológico; moléculas de adhesión asociadas a la fijación del microorganismo hacia ciertas proteínas de la célula hospedadora como la elastina, colágeno, fibrinógeno y fibronectina (1, 7). Cabe

destacar que el principal factor de virulencia descrito para este grupo de microorganismos es la capacidad de producir biopelícula y para ello, estas especies producen diversas moléculas que contribuyen a la adherencia del microorganismo hacia los materiales inertes como el poliestireno, a la acumulación de células bacterianas así como a la nutrición de las mismas (8-10). Incluso la formación de biopelícula se ha asociado a la resistencia a los antibióticos (9). El nivel de producción de biopelícula por *S. hominis* aún no ha sido esclarecido, ya que en algunos estudios esta microorganismo ha sido reportado como débil productor y en otros como fuerte productor de biofilm (11, 12).

1.4 Epidemiología y espectro clínico de las infecciones causadas por *S. hominis*

Debido a que los ECN forman parte de la flora normal de la piel de humanos, durante mucho tiempo este grupo de microorganismos fueron considerados solamente como agentes contaminantes de medios de cultivos, sin embargo; desde hace dos décadas emergieron a nivel mundial como importantes patógenos oportunistas (7, 13, 14). Actualmente, los ECN representan los principales agentes causales de un amplio espectro de infecciones nosocomiales, entre las que se encuentran frecuentemente endocarditis, osteomielitis, endoftalmitis posquirúrgica, bacteremias; todas ellas asociadas principalmente al uso de dispositivos médicos como catéteres intravenosos, de diálisis peritoneal, válvulas cardíacas, entre otros (1, 7, 15). Los centros para el control y prevención de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos reportaron en el 2008, que los ECN fueron el grupo de microorganismos aislados con mayor frecuencia en distintas infecciones nosocomiales (16).

Dentro de los ECN, *S. hominis* precedido sólo por *Staphylococcus epidermidis*, es la segunda especie aislada con mayor frecuencia de hemocultivos provenientes de neonatos y pacientes con cáncer, es por ello que este microorganismo se asocia principalmente a bacteremias en pacientes inmunodeprimidos (17-20). También existen reportes aislados, pero cada vez con mayor frecuencia, donde se asocia a *S. hominis* como agente causal de endoftalmitis y endocarditis (21, 22).

Existen pocos datos estadísticos que puedan fundamentar la incidencia y prevalencia de *S. hominis* como agente causal de infecciones dentro de los nosocomios, debido a que en la mayoría de los laboratorios clínicos de éstos, la identificación no se realiza hasta nivel especie, por lo que este microorganismo es reportado sólo como ECN, y por consecuencia los datos con los que se cuenta engloban a todas las especies de este género que no son *Staphylococcus aureus* dentro de este grupo.

1.5 Factores de riesgo asociados a infecciones causadas por *S. hominis*

El principal factor de riesgo que predispone a una infección causada por *S. hominis* es la hospitalización por tiempos prolongados, sobretodo en las unidades donde los pacientes requieren el uso de dispositivos médicos como ventiladores pulmonares, catéteres intravenosos, catéteres de diálisis peritoneal, así como los implantes permanentes válvulas cardíacas y/o algún tipo de prótesis (1, 2, 7). Los pacientes con cáncer tienen predisposición a presentar una infección por este microorganismo, debido al uso constante de dispositivos que son necesarios para la administración de fármacos quimioterapéuticos. En general, todos los individuos con

un sistema inmunológico deficiente como los neonatos, pacientes transplantados o con patologías propias del sistema inmune están en riesgo de cursar por una infección causada por *S. hominis* ([17](#), [18](#)).

1.6 Identificación de *S. hominis*

La mayoría de los laboratorios clínicos donde las pruebas se realizan de manera manual, identifican sólo a nivel de grupo de especies, y para ello realizan una tinción de Gram, una prueba de catalasa para identificar al género *Staphylococcus*, y la prueba para diferenciar a la especie patógena del resto que pertenece a este género, se realiza la prueba de coagulasa, si esta es negativa se reporta un ECN. Para identificar de manera bioquímica a nivel especie, las pruebas que se realizan se basan en la asimilación de carbohidratos, y para ello se dispone en el mercado de una gran diversidad de sistemas comerciales automatizados y semi-automatizados que ofrecen una batería de pruebas que contienen los diferentes sustratos por los cuales se pueden discriminar las especies de este género. Entre los más comercializados se encuentran los sistemas Vitek, MicroScan, Sensititre y API, donde este último ha demostrado ser el sistema con menor número de errores en la identificación bioquímica de acuerdo a lo reportado en diversos estudios, en los cuales la precisión y exactitud de dichos sistemas comerciales han sido evaluados y comparados entre sí ([23-25](#)).

Debido a la relación filogenética que existe entre las especies del género, éstas presentan una homología en la asimilación de los distintos carbohidratos, y esto es lógico si se aborda la situación desde el punto de vista que todas ellas habitan en la piel y mucosas de humanos de manera normal, por lo que la identificación a nivel especie basándose en pruebas bioquímicas representa un reto; incluso en métodos

automatizados la identificación de *S. hominis* ha sido reportada como discordante con métodos moleculares (26).

En cuanto a la identificación molecular se ha recurrido a ensayos de PCR en tiempo real y a la secuenciación de los genes 16S rRNA, *sodA*, *hsp60*, *rpoB* y *tuf* para los cuales también se han realizado trabajos de comparación y de relación filogenética entre las especies, ya que existe una alta homología en algunos genes conservados para ciertas especies del género (27-29).

Por lo anterior, y de acuerdo a los resultados de investigación donde se comparan los métodos fenotípicos con los moleculares, actualmente para lograr la identificación a nivel especie de los ECN, se recurre a métodos bioquímicos y moleculares, siendo el sistema API y la secuencia 16S rRNA las pruebas más utilizadas (23, 30).

1.7 Resistencia a los antibióticos y el Casete Cromosómico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

Uno de los principales problemas que dificulta el tratamiento de las infecciones causadas por *S. hominis* entre otras especies de ECN, es la resistencia elevada a diversos antibióticos que presenta este grupo de microorganismos ([31-34](#)). En particular, *S. hominis* cuenta con algunos reportes de resistencia a linezolid, un antibiótico, aprobado en el 2010 por la FDA y que es considerado como de último recurso ([35](#), [36](#)).

Desde 1960 con la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), al poco tiempo después de la introducción de este antibiótico en la práctica clínica, se prestó especial atención al problema de la resistencia a los antimicrobianos ([37-45](#)). Sin embargo, no fue hasta el año 2000 que se elucidó que la resistencia a la clase de antibióticos beta-lactámicos estaba dada por una proteína llamada PBP2a la cual es codificada por el gen *mecA*, el cual reside dentro de un fragmento de DNA exógeno llamado casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), el cual en un principio, en el trabajo publicado por Katayama Y. y colaboradores fue denominado solo como DNA de resistencia en *S. aureus* ([38](#), [46-49](#)). Con el paso del tiempo, a la par de los constantes reportes de ECN como patógenos emergentes en nosocomios y además multifarmacorresistentes, se comenzó a estudiar este grupo de microorganismos y se demostró la existencia de este casete dentro de su genoma ([50-54](#)). Los resultados de trabajos de investigación recientes muestran evidencias que sustentan la hipótesis de que este elemento genético fue transferido de manera horizontal de los ECN hacia las cepas de *S. aureus* y no en sentido contrario como se pensó en un principio ([55](#)). La prevalencia

de resistencia a la meticilina, el cual es marcador de la presencia del SCC*mec*, se ha reportado mayor frecuencia en los ECN que en *S. aureus*, con tasas que van a nivel mundial del 75% al 90% (56). Entre las especies de ECN que poseen el SCC*mec* se han descrito *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. conhii*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. warneri*, y *S. saprophyticus* (57-61).

1.7.1 Mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos por la proteína PBP2a

La resistencia a esta clase de antibióticos es nombrada comúnmente como resistencia a meticilina u oxacilina, la cual es conferida por una proteína de unión a la penicilina, conocida como PBP2a y es codificada por el gen *mecA*. La proteína de unión a la penicilina de manera normal posee dominio con función de transpeptidasa y otro dominio de unión a la penicilina. La función de transpeptidasa es indispensable en la síntesis de la pared celular ya que se encarga de la unión de las cadenas de N-acetilglucosamina y ácido-N-acetilmurámico que la integran; sin embargo, una vez que un antibiótico β -lactámico encuentra su blanco en el dominio de unión a la penicilina, esta proteína pierde su función de transpeptidasa por lo que la síntesis de la pared celular se interrumpe y entonces la célula bacteriana aumenta su presión osmótica y se lisa. En cambio, PBP2a tiene alterado el sitio de unión a los antibióticos β -lactámicos, por lo que estos fármacos no reconocen el blanco, y entonces la proteína continúa con su función normal de transpeptidasa, por lo tanto el microorganismo es resistente a los antibióticos β -lactámicos (48, 49).

1.7.2 Estructura básica del SCC_{mec}

Este casete es considerado un elemento móvil, puede medir entre 15 y 67 kb de longitud. De manera general presenta cuatro características básicas (figura 1):

- Sus extremos se encuentran flanqueados por repeticiones directas e inversas que le permiten su integración en un sitio homólogo del cromosoma.
- En su extremo 3' posee un fragmento de lectura abierto llamado *orfX*
- Presenta un complejo de genes *mec* los cuales determinan la resistencia a meticilina.
- Presenta un complejo de genes *ccr* responsables de la movilidad de este elemento (56, 62).

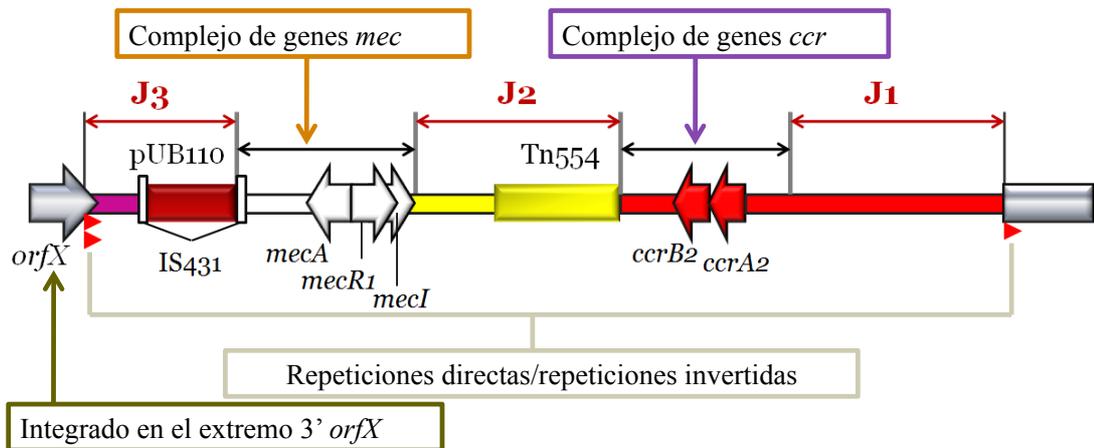


Figura 1. Características básicas de la estructura del SCC_{mec} (63).

La presencia de este elemento genético móvil se ha demostrado en diversas especies bacterianas, sin embargo el enfoque principal de este casete se centró en *Staphylococcus aureus* especie donde fue detectado y descrito por primera vez, así mismo se han identificado diferentes tipos de casete basados en la variedad de complejos de genes *mec* y *ccr* (56). Hasta la fecha, se han descrito once diferentes

tipos SCC*mec* (I a XI) en *S. aureus* (tabla 1), en base a las modificaciones en la región reguladora *mecA* (complejo *mec*), el tipo de recombinasas cromosómicas que posea el casete (*ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* y *ccrC*), y en algunos los determinantes de resistencia dentro de las regiones de unión. La combinación de los complejos genéticos *mec* y *ccr* determinan el tipo de casete, sin embargo aunque dos casete diferentes presenten esta misma combinación, es decir que correspondan al mismo tipo, pueden presentar variabilidad, y esta se encuentra dada por las diferencias encontradas en las regiones de unión, anteriormente llamadas regiones de “depósito de basura (junkyard)” (63).

TABLA 1. Tipos de SCC*mec* descritos para *S. aureus*

Tipo de SCC <i>mec</i>	Tipo de <i>mec</i>	Tipo de <i>ccr</i>
I	B	1
II	A	2
III	A	3
IV	B	2
V	C2	5
VI	B	4
VII	C1	5
VIII	A	4
IX	C2	1
X	C1	7
XI	E	8

1.7.3 Complejo de genes *mec*

Existen 5 diferentes tipos de complejos genes *mec* descritos para *S. aureus* clasificados como A, B, C, D y E (figura 2). Todos los complejos contienen *mecA*, genes reguladores el *mecI* y *mecR1*, además de secuencias de inserción 431. La expresión del gen *mecA* está regulada por dos proteínas, la proteína codificada por el gen *mecI*, la cual funciona como represora y la codificada por el gen *mecR1* funciona como inductora de la transcripción. Cuando *mecI* se une a la región promotora del

gen *mecA*, la transcripción del gen *mecA* se reprime. En cambio, cuando un antibiótico β -lactámico entra a la célula bacteriana, el gen *mecR1* codifica un polipéptido que tiene actividad de proteasa para degradar la proteína represora de *mecI*, como resultado se genera un aumento de la transcripción del gen *mecA*. En algunos complejos *mec*, los genes *mecI* y *mecR1* se suprimen o se truncan, esto es causado la mayoría de las veces por la integración de las secuencias de inserción (56, 62). Por lo anterior, es importante señalar que aunque la transcripción del gen *mecA* se encuentra bien regulada, un estudio reciente reportó una cepa de *S. aureus* en la cual la resistencia a meticilina no se afectaba por la sobreexpresión del gen represor, debido a que éste presentaba una mutación que codificaba una proteína no funcional (64).

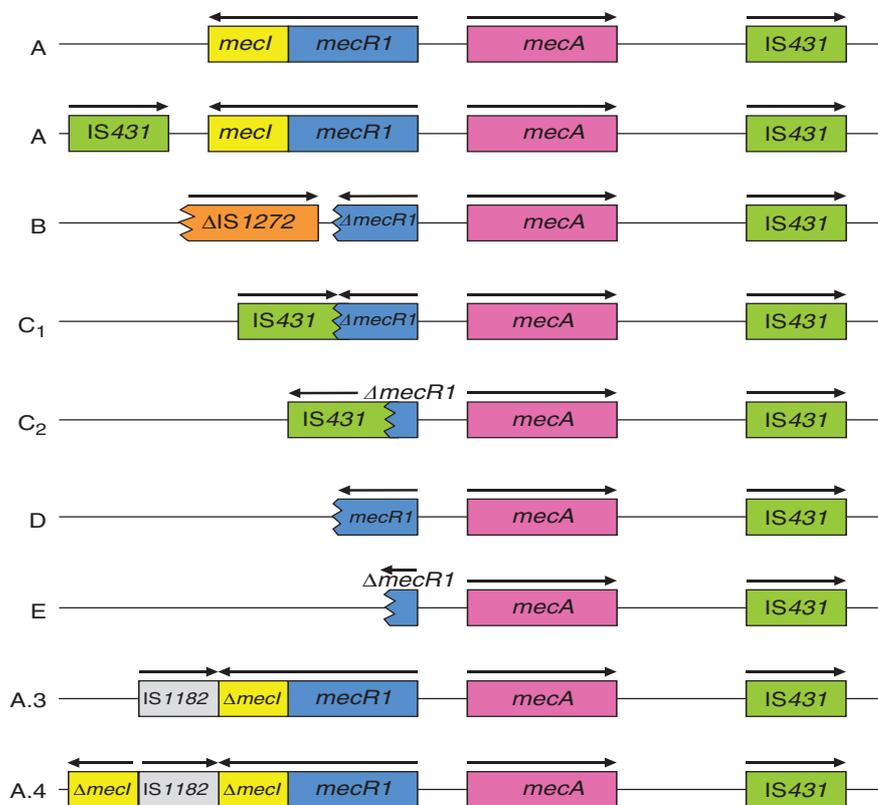


Figura 2. Clases de complejos *mec* descritos para *S. aureus*. *mecI* codifica un represor, *mecR1* codifica un inductor. Las flechas indican la dirección de la transcripción. (56).

1.7.4 Complejo de genes *ccr*

El complejo de genes *ccr* es otro elemento que es determinante del tipo de casete. Se compone de uno o dos genes recombinasa sitio-específicos, y éstos son los responsables de la movilidad de los SCC*mec*. Estos genes catalizan la escisión y la integración precisa del lugar y la orientación específica de los elementos SCC*mec*. Todas las proteínas codificadas por estos genes *ccr* tienen propiedades catalíticas en el dominio N-terminal. Actualmente existen cuatro alotipos bien descritos para los genes *ccrA* y *ccrB* y un solo alotipo de *ccrC* (figura 3). El gen recombinasa *ccrC* se asocia a la resistencia al mercurio y además se ha encontrado en el casete tipo V de *S. aureus* (65). La combinación de estos alotipos determina el tipo de complejo recombinasa. Actualmente están descritos ocho tipos de complejos recombinasa que se han identificado en SCC*mec* de *S. aureus*, los cuales se han designado con números arábigos (63, 66). Cabe señalar que el complejo de genes *ccr* se ha encontrado con una mayor diversidad que el complejo de genes *mec*, tanto en *S. aureus* como en los ECN (67, 68). Por lo anterior, la identificación de éste complejo presenta mayor dificultad; incluso, se han desarrollado algunas herramientas bioinformáticas para tipificar los genes recombinasa con mayor exactitud en base a su secuencia (69).

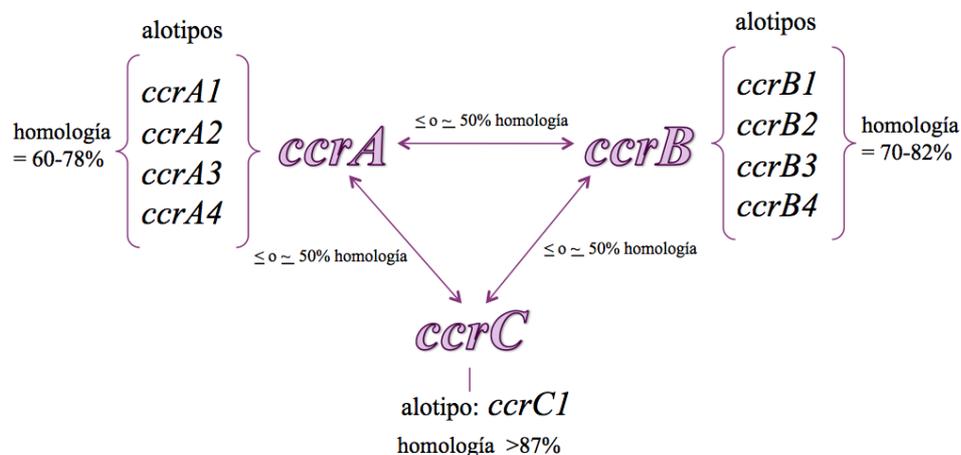


Figura 3. Representación de la homología entre los genes *ccr* y sus alotipos en *S. aureus*

1.7.5 Regiones de unión (J)

En la estructura básica del casete cromosómico estafilocócico se han identificado 3 regiones de unión. La región de unión 1 se encuentra entre la región cromosómica derecha y el complejo de genes *ccr*. Esta región presenta diferencias fundamentales para la identificación de los tipos de casete, basadas en la presencia de algunos genes. La región de unión 2 se localiza entre la región de complejos de genes *ccr* y la de los genes *mec*, y sus diferencias fundamentalmente se basan en la presencia o ausencia de transposones oseudotransposones. La región de unión 2 se localiza entre la región de complejos de genes *mec* y el fragmento de lectura abierto y las diferencias en esta región se basan en la presencia o ausencia de plásmidos.

Existe una nomenclatura propuesta para designar las diferencias entre los subtipos determinados por las regiones de unión, y básicamente pueden nombrarse de 3 maneras distintas, dependiendo en que región localizan las diferencias génicas o de los elementos que la componen. Por ejemplo si las diferencias se marcan en la región de unión 1 estas se designan el tipo de casete en números romanos seguido de letras minúsculas. En cambio si las diferencias son basadas en la presencia o ausencia de elementos genéticos móviles como los plásmidos o transposones el tipo de casete designado con números romanos se escribe seguido de una letra mayúscula, por ejemplo en el caso del tipo de casete IV y el casete IVA la diferencia es que este último es portador del gen plasmídico pUB110. La más reciente propuesta de nomenclatura incluye las diferencias en cada una de las regiones de unión, en donde seguidos del tipo de casete, se representa con números arábigos el tipo de región de unión 1, 2 y 3 respectivamente ([56](#), [66](#)).

1.7.6 SCC No-*mec*

Aunque los diversos tipos de complejos de genes *mec* son determinantes en la clasificación de este casete, existe una nomenclatura establecida para aquellos casetes que no son portadores de este complejo de genes *mec*, pero que poseen otro tipo de genes que confieren virulencia o resistencia a ciertos compuestos, como por ejemplo el casete cromosómico estafilocócico *cap1*, es nombrado así por ser portador de un complejo de genes capsulares, también dentro de este tipo de casetes se encuentra el casete cromosómico *fur* el cual es portador del gen de resistencia al ácido fusídico. El casete cromosómico estafilocócico Hg es portador del gen que confiere resistencia a mercurio, este tipo de casete ha sido identificado en *S. aureus* con un complejo de genes *ccr* diferente al resto de los casetes y mismo que se encuentra adjunto a un casete cromosómico estafilocócico portador de *mecA*. Para los casetes que son portadores de un gen cuya función no ha sido descrita, la nomenclatura propuesta por el grupo internacional de trabajo en los elementos del casete cromosómico estafilocócico indica que este debe nombrarse seguido del nombre de la cepa donde fue identificado ([63](#), [66](#), [70](#)).

1.7.7 Tipificación del casete

Para llevar a cabo la determinación del tipo de casete, se han desarrollado diferentes estrategias metodológicas, en las cuales de manera general consisten en identificar los tipos de complejos de genes recombinasa y complejos de genes *mec*, además de detectar la presencia de plásmidos y transposones que pueden encontrarse en las regiones de unión, y con ello establecer el tipo de casete con su subtipo correspondiente, esto se ha logrado mediante el diseño de una serie de PCR's múltiples con cebadores que amplifican cada región de interés ([71](#), [72](#)). Desde el año

2001 los investigadores Ito y Oliveira propusieron estrategias de este tipo, sin embargo cuanto más tipos de elementos fueron identificados en los casete se hicieron necesarios el uso nuevos cebadores para las regiones recién identificadas (73, 74). Entonces en el año 2005 y 2007, Zhang y Kondo respectivamente sugirieron los que hasta el día de hoy constituyen los métodos más completos para la tipificación de casete (75, 76).

1.8 SCCmec de *S. hominis*

Aunque la mayoría de los trabajos de investigación sobre la distribución de los diferentes tipos de casete entre los ECN han sido exitosos, en la especie *S. hominis* no se ha logrado observar dicha distribución, ya que en estos estudios el casete cromosómico estafilocócico de esta especie es reportado como “no tipificable”, es decir cuando no presentan uno o los dos elementos básicos del casete, o con “nuevo casete”, cuando poseen una combinación diferente a la reportada en las especies de *S. aureus* (tabla 2).

Tabla 2. Estudios que incluyeron aislamientos clínicos de *S. hominis* para la tipificación del SCCmec por metodologías sugeridas para *S. aureus*.

Lugar de estudio	Total de aislamientos	Aislamientos NO tipificables o con nuevo casete	Referencia
Noruega	2	2	(67)
Brasil	13	10	(53)
Finlandia	1	1	(52)
México	4	3	(50)
Túnez	34	22	(61)
México	9	9	(11)

Este hecho sugiere que la especie *S. hominis* presenta diferentes tipos de complejos recombinasa y genes *mec*, por lo tanto puede presentar un tipo de casete distinto a los descritos para *S. aureus*.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus hominis es uno de los principales agentes causales de bacteremia en pacientes inmunodeprimidos, en los cuales el tratamiento se complica debido que este microorganismo presenta resistencia a los antibióticos, principalmente a la clase de los beta-lactámicos. La evidencia sugiere que esta especie presenta una variante del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) descrito para *Staphylococcus aureus*.

Para conocer la diversidad y distribución de este elemento genético en *S. hominis*, así como para entender el desarrollo de la resistencia a los antibióticos y los mecanismos de su propagación, son necesarios estudios básicos que permitan la elucidación de la estructura completa del SCC*mec*.

No existen reportes de la estructura del SCC*mec* de *S. hominis* .

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

Objetivo general

Elucidar la estructura del casete cromosómico estafilocócico *mec* de al menos un aislamiento clínico de *Staphylococcus hominis*.

Objetivos específicos

1. Identificar aislamientos de *Staphylococcus hominis* a partir de especímenes clínicamente relevantes mediante métodos bioquímicos y moleculares.
2. Caracterizar los aislamientos por electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP) para determinar la presencia de clonas y selección de las mismas.
3. Determinar el fenotipo de resistencia a los antibióticos.
4. Tipificar el SCC*mec* por los métodos recomendados para *S. aureus* y seleccionar al menos tres candidatos con nuevo casete.
5. Elucidar de manera teórica la estructura de un nuevo SCC*mec* a partir de los resultados del fenotipo de resistencia a los antibióticos y de la tipificación.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

En un primer paso, los aislamientos fueron sometidos a reactivación metabólica y a partir de los cultivos jóvenes se inició con la identificación precisa a nivel especie mediante pruebas primarias, el uso del sistema API Staph y la secuenciación de los genes conservados 16S rRNA y del factor de elongación *tu* (*tuf*). Una vez identificados los aislamientos como *S. hominis*, se empleó la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados con la finalidad de detectar y seleccionar clonas. Posterior a esto se determinó el fenotipo de resistencia a los antibióticos siguiendo el protocolo establecido en los documentos M02-A11 y M07-A9. Enseguida se procedió a la tipificación del casete por medio de los métodos de Zhang y Kondo sugeridos para *S. aureus*, y en base a éstos resultados, se seleccionaron 3 aislamientos candidatos a un nuevo casete. Por último se realizó un análisis de los aislamientos seleccionados tomando en cuenta los resultados del fenotipo de resistencia a los antibióticos y de la tipificación molecular del casete; con estos datos se determinaron los tipos de complejos genéticos recombinasa, de complejos *mec* y la presencia de elementos asociados a la resistencia de diversos antibióticos dentro de las regiones de unión, con lo anterior se construyó de manera teórica, la estructura de un nuevo casete cromosómico estafilocócico *mec* de *S. hominis*.

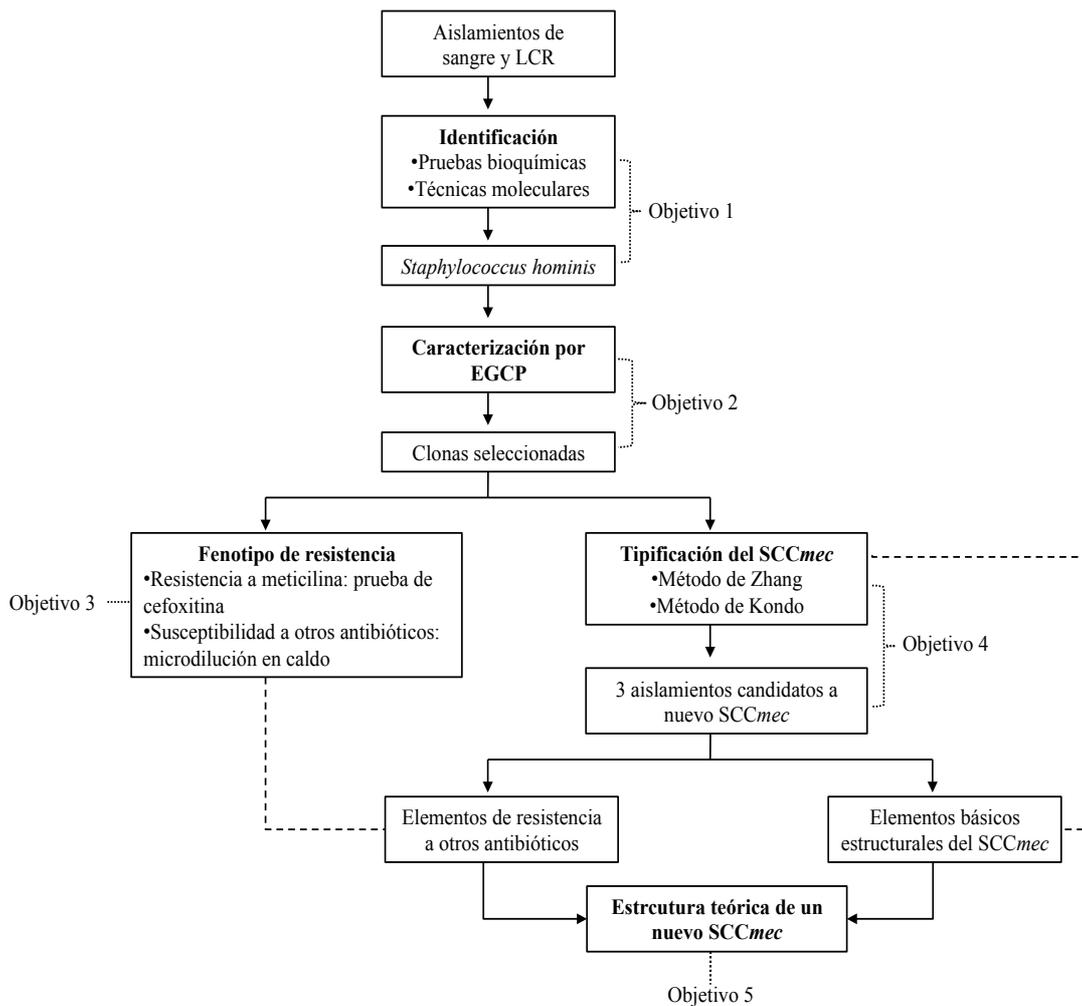


Figura 4. Esquema de la estrategia general experimental

4.2 Aislamientos clínicos

Se colectaron 103 aislamientos clínicos, provenientes de sangre o líquido cefalorraquídeo, que cumplieron con los criterios propuestos por la CDC y por la NOM-045-SSA2-2004 como agentes causales de bacteremia (77, 78). Estos fueron recolectados en el Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL desde el 2006 al 2011, y enviados al Laboratorio de Microbiología Molecular del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

4.3 Identificación bioquímica

Cada aislamiento fue sembrado en agar sangre e incubado durante 24 h a 37°C. A partir de los cultivos jóvenes se realizaron las pruebas primarias de identificación: Tinción de Gram, producción de catalasa, coagulasa, oxidasa (ver apéndice A). Todos los aislamientos que fueron cocos Gram positivos, producción de catalasa positiva, oxidasa negativa y coagulasa negativa, fueron seleccionados como candidatos a ser *S. hominis*, por lo que se les realizó la identificación bioquímica a nivel especie por medio de la galería de asimilación de carbohidratos del sistema API® Staph (BioMérieux®, Inc., Durham, USA), para lo cual se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

4.3.1 API® Staph

- Preparación de la galería. Se llenó cada pocillo de la cámara con agua destilada (5 mL aproximadamente) para crear una atmósfera húmeda.
- Preparación del inóculo. Se realizó un precultivo en agar sangre el cual se incubó por un periodo entre 18-24 h a 37°C, posterior a esto se verificó la pureza del cultivo, con las colonias jóvenes se preparó una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a 0.5 de McFarland, para ello se transfirieron de 3-5 colonias a la ampolla de API Staph Medium (extracto de levadura, bactopectona, oligoelementos, agua desmineralizada, pH 7.0-7.4).
- Inoculación de la galería. Con un pipeta se tomó la suspensión bacteriana y se rellenó cada microtubo sin sobrepasar el nivel del tubo. Para las pruebas que se llevan a cabo bajo una atmósfera de anaerobiosis (arginina dihidrolasa y

ureasa) se rellenaron los microtubos hasta el borde de la cúpula con aceite de parafina. Finalmente se cerró la cámara y se incubó durante 18-24 h a 37°C.

- Lectura e interpretación de resultados. Después de la incubación se agregó 1 gota de los reactivos indicados por el fabricante para las pruebas de reducción de nitratos a nitritos, fosfatasa alcalina y Voges-Proskauer, posterior a esto la galería abierta se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos, transcurrido este tiempo el resultado de cada prueba fue interpretado de manera visual de acuerdo al esquema provisto por el sistema API® Staph (Figura 4a y 4b), y estos fueron depositados en el software que se encuentra en la plataforma apiweb™: <http://apiweb.biomerieux.com/>, en la cual aparece como resultado final la especie a la que corresponde cada aislamiento.

Durante todo el proceso de identificación bioquímica se empleo como control la cepa ATCC de *S. hominis* 27844.

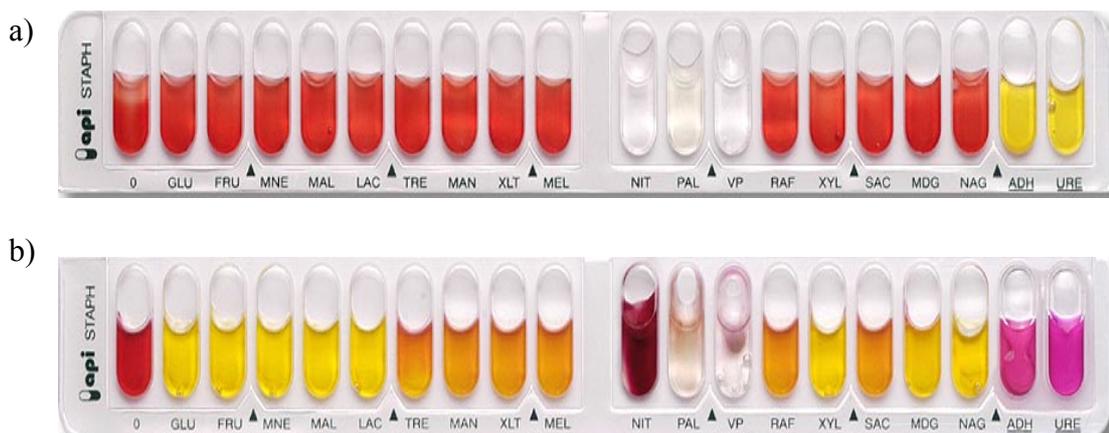


Figura 5. Esquema de colores para la interpretación de las pruebas. a) Pruebas negativas, b) Pruebas positivas.

4.4 Identificación molecular

Para confirmar la identidad de los aislamientos que resultaron como *S. hominis* mediante las pruebas bioquímicas, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de los genes 16S rRNA y *tuf*.

4.4.1 Obtención de DNA bacteriano por lisis térmica

Para llevar a cabo la obtención del material genético de los aislamientos, éstos se sembraron en placas de agar sangre, las cuales se incubaron durante 24 h a 37°C, posterior a esto se preparó una suspensión bacteriana en un tubo eppendorf estéril, para lo cual se tomó un inóculo entre 8-10 colonias del cultivo puro y se homogenizó mediante agitación con vórtex en 50 µL de agua destilada estéril, ésta suspensión se sometió a ebullición (Baño de agua LAB-LINE®, Imperial IV) llevándola a 100°C durante 5 minutos, posterior a esto se centrifugó por 5 minutos a 14, 000 rpm (Centrífuga Labnet, Hermle Z 233 MK-2), se descartó el precipitado y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf estéril. El DNA obtenido fue almacenado a 4°C hasta su utilización.

4.4.2 Amplificación del gen 16S rRNA

Se realizó una PCR de tiempo final empleando el material genético obtenido por el método de lisis térmica y con los iniciadores reportados previamente en 2004 por Pei y cols.(27). Las secuencias de los iniciadores empleados son las siguientes: 16S rRNA-Forward 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' y 16S rRNA-Revers 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, E.U.A.); los cuales generan productos de PCR ≈1500 pb.

Para la mezcla de PCR añadieron 2 µL de DNA a 48 µL de una mezcla de reacción compuesta por: buffer de reacción NH₄ 1X pH 8.8, MgCl₂, 1.5 mM,

dNTP's 0.8 mM, cada iniciador a 15 pMol y 2 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 3 min a 95°C para la desnaturalización inicial; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 50°C por 1 min, elongación a 72°C por 1 min y por último 1 ciclo a 72°C por 1 min para la elongación final (Termocicladores: "PCR Sprint, Hybaid; PxE 0.2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation y MultiGene, Labnet).

Para verificar la presencia del producto de PCR esperado, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1.5% empleando una cámara de electroforesis Thermo Maxicell® Primo EC 340, el cual se sometió a 120 V por 45 min y se tiñó con bromuro de etidio (2 µg/mL), se empleó un marcador de peso molecular de 200-10,037 pb (HyperLadder™ I, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). Finalmente el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm empleando un fotodocumentador UVP Bioluming Systems. EpiChemi 3 Darkroom. Las imágenes fueron documentadas en formato digital mediante el software Labworks™.

4.4.3 Amplificación del gen *tuf*

Se realizó una PCR de tiempo final empleando el material genético obtenido por el método de lisis térmica y con los iniciadores reportados previamente en 2001 por Martineau y cols. (79). Las secuencias de los iniciadores empleados son las siguientes: TStaG422 5'-GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA-3' y TStag765 5'- TIACCATTTTCAGTACCTTCTGGTAA-3' (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, E.U.A.); los cuales generan productos de PCR ≈370 pb.

Para la mezcla de PCR se añadieron 4 µL de DNA a 46 µL de una mezcla de reacción compuesta por: NH₄ 1X pH 8.8, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 0.8 mM, cada

iniciador a 10 pMol y 2 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 3 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, alineamiento a 50°C por 45 s, elongación a 72°C por 45 s y por último 1 ciclo a 72°C por 3 min para la elongación final.

Para verificar la presencia del producto de PCR esperado, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (2 µg/mL), el cual se sometió a 100 V por 45 min, empleando un marcador de 100-1,000 pb (HyperLadder™ IV, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). Por último, el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm y las imágenes se documentaron en formato digital.

Enseguida se verificó la presencia de los productos esperados mediante una electroforesis convencional posterior a esto los productos se purificaron mediante el método de precipitación con etanol.

4.4.4 Purificación de productos de PCR: método de precipitación con etanol

1. Cada producto de PCR (50 µL) fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 5 µL de acetato de sodio 3 M pH 4.6 y 100 µL de etanol al 95%.
2. La mezcla se homogenizó por agitación con vórtex y se mantuvo a -20°C durante 30-40 min.
3. Se centrifugó por 20 min a 14, 000 rpm y se descartó el sobrenadante.
4. Se lavó con 300 µL de etanol al 70% y se agitó en vórtex.
5. Se centrifugó en frío por 10 min a 14, 000 rpm y se descartó el sobrenadante.
6. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche
7. Se resuspendió en 50 µL de agua estéril grado molecular.

Una vez que los productos fueron purificados, se enviaron al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron alineadas e identificadas mediante la Herramienta de Búsqueda y Alineamiento Local Básico (BLAST) disponible en la plataforma del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. En base a estos datos los aislamientos fueron identificados como *S. hominis*, cuya secuencia presentó un porcentaje de homología igual o mayor al 98% con esta especie dentro de la plataforma ya mencionada.

La identificación definitiva se determinó tomando como parámetro la concordancia entre los resultados de las identificación bioquímica con la identificación molecular.

4.5 Determinación de clonas: electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP)

Para identificar y determinar la presencia de clonas, los aislamientos identificados definitivamente como *S. hominis* fueron sometidos a electroforesis en gel de campos pulsados. Se tomó como referencia la metodología sugerida para *S. aureus* (80, 81) con algunas modificaciones recomendadas para *S. hominis* (61). El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente:

1^{er} día

1. Se sembraron los aislamientos en agar soya tripticaseína (TSA) en placa.

2^o día

2. A partir del cultivo anterior se inoculó una asada de una sola colonia en 5 mL de caldo triptona soya (TSB). Se incubaron hasta fase exponencial (16-18 h) a 37°C.

3^{er} día

3. Se fundió agarosa al 1.5% (Agarosa Certificada para Campos Pulsados, Bio-Rad, Inc., CA, E.U.A.) con buffer TBE 0.5X en microondas y se mantuvo entre 40-42°C mediante calentamiento en baño de agua. Se prepararon 150 µL de agarosa por cada muestra
4. Se transfirieron 2 mL de cultivo líquido a un microtubo y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm
5. Se eliminó todo el sobrenadante sin remover la pastilla
6. Se añadió a la pastilla 1 mL de PIV frío, se agitó en vórtex hasta disolver y se centrifugó por 5 min a 14000 rpm
7. Se preparó una mezcla de reacción para la lisis celular: lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Canadá), lisostafina (Sigma-Aldrich Co., E.U.A.) y

RNAsa (Epicentre, Inc., Madison, WI, E.U.A.) a concentraciones de 10 mg/mL

Reactivo	Volumen necesario	Cantidad a añadir
Lisozima	10 μ L/muestra	0.1 mg/muestra
Lisostafina	10 μ L/muestra	0.1 mg/muestra
RNAsa	5 μ L/muestra	10 μ L/muestra

Posterior a eso se añadieron a la mezcla las 3 enzimas al buffer EC que cambia a EC-lisis y se dejó a temperatura ambiente (se preparó 1 mL de EC por muestra)

8. Se eliminó el PIV de cada tubo
9. Se añadieron 410 μ L de PIV a cada muestra y se agitó en vórtex para disolver la pastilla
10. Se colocaron 150 μ L de agarosa fundida a cada tubo, uno por uno, se agitó en vórtex, esto se realiza una muestra a la vez para evitar que solidifique la agarosa.
11. Para preparar un disco de agarosa: se colocaron 35 μ L de la muestra con agarosa sobre un portaobjetos estéril forrado con papel parafilm (se prepararon entre 5-7 discos por muestra)
12. Se dejaron enfriar los discos a temperatura ambiente por 5 min y se transfirieron a un tubo de 15 mL
13. Se añadió 1 mL de EC-lisis al tubo y los discos se llevaron al fondo, sin agitar en exceso para evitar que se rompan.
14. Se incubó por 3 h a 37°C
15. Se preparó una solución ESP (1 mL por muestra): se añadió 1 mg de proteinasa K a 1 mL de ES

16. El sobrenadante de EC-lisis se decantó con una gasa estéril, teniendo cuidado de no desechar los discos

17. Se añadió 1 mL de solución ESP y se incubó toda la noche a 37°C (mínimo 17 h).

4° día

18. La solución se filtró con una gasa estéril, y se añadió 13 mL de TE 1X

19. Se agitó por inversión 1 h, y los pasos 18 y 19 se repitieron 5 veces, posterior a estos lavados los tubos con buffer TE 1X se almacenaron a 4°C hasta el siguiente día.

5° día

20. Se preparó el buffer para la restricción 10X (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) de la siguiente manera:

Reactivo	1 reacción
Buffer 10X (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, KCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, Tritón X-100 0.15%, BSA 0.01%, Glicerol 50%)	5 µL
Agua estéril grado molecular	35 µL

21. Se transfirieron con pinzas los discos a un microtubos de 2 mL y se añadieron 40µL de buffer de restricción (sin enzima) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para atemperar.

22. Se preparó la enzima *Xho* I (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) de la siguiente manera:

Reactivo	1 reacción
Buffer 10X	5 µL
Agua estéril grado molecular	33 µL
Enzima <i>Xho</i> I (10 U/µL)	2 µL

23. Se colocaron los discos en las paredes del microtubo para poder sacar los 40 µL del buffer de restricción sin enzima.

24. Se añadieron los 40 μ L del buffer de restricción con enzima y se incubó toda la noche a 37°C.

6° día

25. Se limpió el equipo (CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad) con agua destilada estéril y una pequeña cantidad de cloro (10 mL aproximadamente) y se dejó por 20 min, se sacó el agua y se repitió el procedimiento pero sin cloro.

26. Se sacaron los discos de la incubación, y se añadieron 4 μ L de buffer de carga 10X que contiene: SDS 0.9%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.05% (Takara Bio Inc., Shiga, Japón).

27. Se prepararon 7 L de TBE 0.5X

28. Se preparó el equipo, se verificó que no tuviera corriente y se apagó la bomba

29. Se preparó el gel de agarosa al 1% con 150 mL de buffer, y se preparó un excedente de 10 mL.

30. Los 5 L de TBE 0.5X se añadieron a la cámara y se dejó hasta que el equipo alcanzara los 14°C

31. Se vació la agarosa a la placa, se colocó el peine, y los 10 mL excedentes de agarosa se dejaron en baño de agua a 50°C

32. Los discos de agarosa se colocaron en el gel, el marcador de PM al principio y al final, los pocillos se cubrieron con el gel con la agarosa que estaba a 50°C

33. El gel se colocó en el equipo y programaron las siguientes condiciones: primer bloque T inicial 2 s, T final 20 s, tiempo de corrida 11 h; segundo bloque T inicial 2 s, T final 7 s, tiempo de corrida 15 h; voltaje 6 V, ángulo 120.

7° día

34. Se retiró el gel del equipo y se tiñó con bromuro de etidio 1 µg/mL por 5 min y se enjuagó con agua destilada, por último se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm (Fotodocumentador UVP Bioluminescence Imaging Systems. EpiChemi 3 Darkroom).

El análisis del patrón de bandas se realizó de manera visual tomando en cuenta los criterios establecidos para esta técnica (82); y con ello se creó una base de datos la cual fue analizada por el programa estadístico SPSS® versión 20, utilizando el método de conglomeración del vecino más próximo con la medida binaria de Jaccard y como resultado final se obtuvo un dendograma con el objetivo de establecer los porcentajes de similitud entre los patrones de restricción de los aislamientos para poder determinar la presencia de clonas.

4.6 Determinación del fenotipo de resistencia a los antibióticos

Para determinar la resistencia a metilina se realizó la prueba de difusión en disco con cefoxitina (83). Posterior a esto, se realizaron pruebas de susceptibilidad a diversos antibióticos por el método de microdilución en caldo (84). La lectura de los resultados fue de manera visual y la interpretación de éstos fue de acuerdo a lo estipulado en el documento M100-S2 del CLSI (85).

4.6.1 Prueba de susceptibilidad a metilina: difusión en disco con cefoxitina

A partir de un cultivo joven en agar sangre se preparó un inóculo en solución salina por suspensión directa de las colonias, el cual se ajustó a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL aproximadamente). Enseguida se inoculó la suspensión preparada en agar Müller-Hinton, con un hisopo estéril se

estrió de manera homogénea en toda la superficie de la placa, se dejó secar durante 3-5 minutos y con una pinza estéril se colocó el disco de cefoxitina al centro de la placa. Se incubó durante 24 h a 37°C y se midieron los halos de inhibición. Para el control de calidad se empleó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La interpretación fue de acuerdo a los siguientes criterios:

Diámetro de la zona de inhibición (mm)	
Susceptible	Resistente
≥ 25	≤ 24

4.6.2 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos: microdilución en caldo

Los antibióticos y las concentraciones utilizadas se seleccionaron en base a lo establecido por el CLSI (figura 6) y fueron adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich® (Toluca, Estado de México). Como primer paso todos los aislamientos fueron sembrados en agar Müeller-Hinton y se incubaron por 24 h a 37°C. Por cada aislamiento se preparó una placa de 96 pocillos (12 x 8) con diluciones seriadas de los antibióticos a evaluar de la manera que se especifica en la figura 6. Las placas se llenaron utilizando una pipeta multicanal con 200 µL de la concentración más alta de antimicrobiano en la primera celda de cada antibiótico. Posteriormente se añadió un volumen de 100 µL de caldo Müeller-Hinton en todos los pocillos con excepción de los que tienen los antibióticos con la concentración más alta y las diluciones se realizaron haciendo pases consecutivos de 100 µL (2 a la 3, 3 a la 4, 4 a la 5 etc) de una celda a la otra empleando una micropipeta y se eliminaron 100 µL de la última celda de cada antibiótico, de tal manera que antes del inóculo todas las celdas quedaran con un volumen total de 100 µL. Los dos últimos pocillos de la última fila se dejaron como controles negativos.

Posterior a la incubación de los cultivos, se prepararon los inóculos por suspensión de las colonias en 5 mL de solución salina que se ajustó a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland, enseguida se realizó una dilución 1:10 en 15 mL de caldo Müeller-Hinton. El inóculo final fue de 5×10^5 UFC/mL y enseguida (15 minutos antes tras su preparación) se transfirieron con una pipeta multicanal 100 μ L del inóculo a cada pocillo de la placa, con excepción de los controles negativos.

Las placas se incubaron a 37°C durante 16-20 horas. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación no se apilaron más de cuatro a cinco placas dentro de la incubadora. Después del periodo de incubación se procedió a realizar la lectura de los resultados. La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhiba completamente el crecimiento del microorganismo en estudio. La interpretación de los resultados se realizó tomando como referencia el crecimiento observado en los pocillos usados como control positivo. Los controles positivos presentan una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para la lectura se utilizó un lector con espejo en el que se reflejó la parte inferior de la placa de microtitulación. Para el control de calidad se empleó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

+	PEN 1	PEN 0.5	PEN 0.25	PEN 0.125	VAN 32	VAN 16	VAN 8	VAN 4	VAN 2	VAN 1	VAN 0.5
AMP 1	AMP 0.5	AMP 0.25	AMP 0.125	AUG 16/8	AUG 8/4	AUG 4/2	AUG 2/1	AUG 1/0.5	ERY 16	ERY 8	ERY 4
ERY 2	ERY 1	ERY 0.5	ERY 0.25	ERY 0.125	TET 32	TET 16	TET 8	TET 4	TET 2	TET 1	CIP 8
CIP 4	CIP 2	CIP 1	CIP 0.5	CIP 0.25	NIT 256	NIT 128	NIT 64	NIT 32	NIT 16	NIT 8	CTX 64
CTX 32	CTX 16	CTX 8	CTX 4	CTX 2	CTX 1	TMP 32	TMP 16	TMP 8	TMP 4	TMP 2	CHL 64
CHL 32	CHL 16	CHL 8	CHL 4	CHL 2	RIF 8	RIF 4	RIF 2	RIF 1	RIF 0.5	RIF 0.25	LZD 16
LZD 8	LZD 4	LZD 2	LZD 1	GEN 32	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	DAP 8	DAP 4
DAP 2	DAP 1	DAP 0.5	DAP 0.25							-	-

Figura 6. Esquema de la distribución de los antibióticos y las concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) utilizadas en la placa de microtitulación. PEN: penicilina, AMP: ampicilina, AUG: amoxicilina-ácido clavulánico, ERY: eritromicina, TMP: trimetoprim, CIP: ciprofloxacino, TET: tetraciclina, DAP: daptomicina, CHL: cloranfenicol, GEN: gentamicina, RIF: rifampicina, NIT: nitrofurantoína, CTX: cefotaxima, VAN: vancomicina, LZD: linezolid.

4.7 Tipificación del SCC mec

Para lograr la tipificación del casete, se llevó a cabo una estrategia experimental basada en dos metodologías distintas sugeridas para la *S. aureus* en 2005 y 2007 por Zhang y cols., y Kondo y cols. respectivamente (75, 76). Para ambos métodos se realizaron cultivos de los aislamientos en agar sangre a 37°C por 24 h y a partir de ellos se obtuvo el DNA por lisis térmica, mismo que se utilizó para las PCR's.

4.7.1 Método de Zhang y cols.

Se realizaron cuatro PCR's, tres múltiples y una convencional, la primera de ellas para determinar el tipo de casete, la segunda para la clase de *mec*, la tercera para el tipo de *ccr* y la última para clase de *ccrC*.

Para las cuatro PCR's los volúmenes de reacción se estandarizaron de la manera siguiente: se añadieron 5 μL de DNA a 20 μL de una mezcla de reacción

compuesta por buffer de reacción NH₄ 1X pH 8.8, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 0.8 mM, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.) y los iniciadores (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, E.U.A) se añadieron en diferentes concentraciones (tabla 3).

Las tres primeras PCR's (tipo de casete, *mec* y *ccr*) se realizaron bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, alineamiento a 65°C por 45 s, elongación a 72°C por 1.5 min; y otros 25 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 45 s, 72°C por 1.5 min; y por último 1 ciclo a 72°C por 10 min para la elongación final.

Para la PCR convencional (determinación de *ccrC*) las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 50°C por 45 s, elongación a 72°C por 45 s; y por último 1 ciclo a 72°C por 10 min para la elongación final.

4.7.2 Método de Kondo y cols.

Se realizaron seis PCR's múltiples: M-PCR 1 y M-PCR 2, para determinar el tipo de casete; M-PCR 3 y M-PCR 4, para asignar el subtipo de casete en base a los elementos contenidos en la región de unión 1; M-PCR 5 y M-PCR 6 para identificar plásmidos y transposones en la región de unión 3.

La secuencia de los iniciadores (Alpha DNA, Montreal, Canadá) y región de amplificación se encuentran en la tabla 4.

Para M-PCR 1 los volúmenes de reacción fueron los siguientes: se añadieron 2 µL de DNA a 23 µL de una mezcla de reacción compuesta por buffer de reacción

NH₄ 1X pH 8.8, MgCl₂ 3.2 mM, dNTP's 0.8 mM, 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.) y 0.1 μM de cada iniciador. De M-PCR 2 a M-PCR 5 los volúmenes de reacción fueron iguales que para la M-PCR 1, excepto por la concentración de MgCl₂ que fue de 2 mM. Para la M-PCR 6 se empleó un kit de reacción que incluye *Taq* DNA polimerasa de alta eficiencia (Platinum®, Invitrogen, Foster City, CA, E.U.A), y la mezcla de reacción para un volumen final de 25 μL fue: 2 μL DNA, buffer de alta eficiencia 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 0.1 mM, DTT 1mM, glicerol 50%), dNTP's 0.8 mM, MgSO₄ 2 mM, cada iniciador 0.2 μM y 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa de alta eficiencia.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: para M-PCR 1, 1 ciclo de 2 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 2 min, alineamiento a 57°C por 1 min, elongación a 72°C por 2 min; y por último 1 ciclo a 72°C por 2 min para la elongación final. Para las M-PCR 2 a M-PCR 5 se emplearon las mismas condiciones de amplificación que en la M-PCR 1, excepto por la temperatura de alineamiento que fue de 60°C. Para la M-PCR 6, 1 ciclo de 2 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 s, alineamiento a 50°C por 30 s, elongación a 68°C por 8 min; y otros 20 ciclos a 94°C por 15 s, 50°C por 30 s, 68°C por 12 min; y por último 1 ciclo a 72°C por 7 min para la elongación final.

Tabla 3. Iniciadores empleados en la tipificación del SCC*mec* por el método de Zhang y cols.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	[μ M] ^a	(pb) ^b	Especificidad
Tipo I-F Tipo I-R	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	0.048	613	SCC <i>mec</i> I
Tipo II-F Tipo II-R	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	0.032	398	SCC <i>mec</i> II
Tipo III-F Tipo III-R	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	0.04	280	SCC <i>mec</i> III
Tipo IVa-F Tipo IVa-R	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	0.104	776	SCC <i>mec</i> IVa
Tipo IVb-F Tipo IVb-R	TCTGGAATTACTIONCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	0.092	493	SCC <i>mec</i> IVb
Tipo IVc-F Tipo IVc-R	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	0.078	200	SCC <i>mec</i> IVc
Tipo IVd-F5 Tipo IVd-R6	CTCAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	0.28	881	SCC <i>mec</i> IVd
Tipo V-F Tipo V-R	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	0.06	325	SCC <i>mec</i> V
MecA147-F MecA147-R	GTGAAGATATACCAAGTGATT ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	0.046	147	<i>mecA</i>
mecI-F mecI-R	CCCTTTTTTATAACAATCTCGTT ATATCATCTGCAGAATGGG	0.08	146	<i>mec</i> clase A
IS1272-F mecR1-R	TATTTTTGGGTTTCACTCGG CTCCACGTTAATTCCATTAATACC	0.08	1,305	<i>mec</i> clase B
ccrAB- β 2	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	0.08		
ccrAB- α 2	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	0.08	700	<i>ccr</i> tipo 1
ccrAB- α 3	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	0.08	1,000	<i>ccr</i> tipo 2
ccrAB- α 4	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	0.08	1,600	<i>ccr</i> tipo 3
ccrC-F ccrC-R	ATGAATTCAAAGAGCATGGC GATTTAGAATTGTCGTGATTGC	0.08	336	<i>ccr</i> tipo 5

^a Concentración del iniciador requerida para la reacción de amplificación

^b Tamaño del producto esperado

Tabla 4. Iniciadores empleados para la tipificación del SCC*mec* por el método de Kondo y cols.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Genes o alelos	Producto (pb)
M-PCR 1			
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i> (mA1-mA2)	286
mA2	AACGTTGTAACCACCCAAGA	<i>ccrA1-ccrB</i> (1-βc)	695
1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT		
2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT		
3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA2-ccrB</i> (2-βc)	937
βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	<i>ccrA3-ccrB</i> (3-βc)	1,791
4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT		
β4.2	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT	<i>ccrA4-ccrB4</i> (4.2-β4.2)	1,287
R	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT		
F	CGTCTATTACAAGATGTAAAGGATAAT		
M-PCR 2			
mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecA-mecI</i> (mA7-mI6)	1,963
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	upstream de <i>mecA</i> (mA7-IS7)	804
IS2(iS-2)	TGAGGTTATTTCAGATATTTTCGATGT		
mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA	<i>mecA-IS431</i> upstream de <i>mecA</i> (mA7-IS2[iS-2])	
M-PCR 3			
1a3	TTTAGGAGGTAATCTCCTTGATG	E007 en tipo I.1SCC <i>mec</i> (1a3-1a4)	154
1a4	TTTTGCGTTTGCATCTCTACC	CQ02 en tipo V.1(IVa) SCC <i>mec</i> (4a1-4a3)	458
4a1	TTTGAATGCCCTCCATGAATAAAAT		
4a3	AGAAAAGATAGAAGTTCGAAAGA		
4b3	AACCAACAGTGGTTACAGCTT	M001 en tipo IV.2(IVb) SCC <i>mec</i> (4b3-4b4)	726
4b4	CGGATTTTAGACTCATCACCAT	CR008 en tipo IV.3(IVc) SCC <i>mec</i> (4c4-4c5)	259
4c4	AGGAAATCGATGTCATTATAA		
4c5	ATCCATTTCTCAGGAGTTAG	CD002 en tipo IV.4(IVd)SCC <i>mec</i> (4d3-4d4)	1,242
4d3	AATTCACCCGTACCTGAGAA		

4d4	AGAATGTGGTTATAAGATAGCTA		
M-PCR 4			
kdpB1	GATTACTTCAGAACCAGGTCAT	<i>kdpB</i> tipo II.1(Ia) <i>SCCmec</i> (kdpB1-kdpB2)	287
kdpB2 2b3	TAAACTGTGTCACACGATCCAT GCTCTAAAAGTTGGATATGCG	SA01 en tipo II.2 (IIb) <i>SCCmec</i> (2b3-2b4)	1,518
2b4 4b3	TGGATTGAATCGACTAGAATCG AACCAACAGTGGTTACAGCTT	II E03 en tipo I.3(II E) <i>SCCmec</i> orM001 en tipo IV.2(IVb) <i>SCCmec</i> (4b3-4b4)	726
4b4 II4-3	CGGATTTTAGACTCATCACCAT GTACCGCTGAATATTGATAGTGAT	RN06 en tipo II.4 <i>SCCmec</i> (II4-3-II4-1)	2,003
II4-1 3a1	ACTCTAATCCTAATCACCGAAC ATGGCTTCAGCATCAATGAG	Z004 en tipo III.1 <i>SCCmec</i> (3a1-3a2)	503
3a2 5a1	ATATCCTTCAAGCGCGTTTC ACCTACAGCCATTGCATTATG	V024 en tipo V <i>SCCmec</i> (5a1-a2)	1,159
5a2	TGTATACATTTGCGCCACTAGCT		
M-PCR 5			
ermA1	TGAAACAATTTGTA ACTATTGA	<i>ermA</i> -CN030 o CZ021 en J2 región tipo II.1(IIa) o tipo III.1 <i>SCCmec</i> (ermA1-mN5)	2,756
cad4	ATTGCGATTCTTTCCGATATGG	<i>cadB</i> -CN030 o CZ021 in J2 región tipo II.1(IIa) o tipo III.1 <i>SCCmec</i> (cad4-mN5)	1,540
M-PCR 6			
ant1	CAGACCAATCAACATGGCACC	<i>mecA-ant</i> (4') en pUB110(mA1-ant1)	4,952
pT181-2	AGGTTTATTGTC ACTACAATTGA	<i>mecA-tetK</i> in pT181(mA1-pT181-2)	7,406
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG		

4.8 Elucidación de la estructura teórica del nuevo SCCmec de *S. hominis*

Para construir la estructura teórica de los aislamientos seleccionados como candidatos a un nuevo casete, lo primero que se realizó fue un análisis de los resultados obtenidos de la tipificación y a partir de estos se determinaron los complejos de genes *mec* y genes *ccr* localizados en cada casete. Con apoyo de las bases de datos proporcionadas por el Grupo Internacional de Trabajo del SCC (IWG-SCC), en la plataforma <http://www.staphylococcus.net/> se compararon los complejos genéticos encontrados en este estudio con los descritos para *S. aureus* y algunas especies de ECN, y de esta manera se definió la localización aproximada de los elementos. De acuerdo a los resultados del fenotipo de resistencia a los antibióticos se infirió la presencia de algunos elementos genéticos como plásmidos o transposones, mismos que son acarreadores de genes asociados a la resistencia de diferentes clases de antibióticos (tabla 5).

Tabla 5. Genes de resistencia localizados en elementos móviles dentro del SCCmec (72).

Elemento genético	Tipo de SCCmec	Gen	Resistencia
pUB110	I, II, IVa	<i>ble</i> <i>ant4'</i>	bleomicina tobramicina
Tn554	II, SCCHg, VIII	<i>ermA</i> <i>aad9/spc</i>	eritromicina estreptomicina
SCCHg	III	<i>mer</i>	mercurio
pT181	III	<i>tet</i>	tetraciclina
ΨTn554	III	<i>cad</i>	cadmio
Tn4001	IV	<i>aacA-aphD</i>	aminoglucósidos

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Identificación bioquímica y molecular

De los 103 aislamientos incluidos, se identificaron 57 (55%) *S. epidermidis*, 11 (13%) *S. haemolyticus*, 4 (4%) *S. cohnii*, 2 (2%) *S. xylosum*, 1 (1%) *S. capitis*, 1 (1%) *S. lentus*, 1 (1%) *S. chromogenes*, 1 (1%) *S. lugdunensis* y 22 (21%) *S. hominis*. (tabla 6). El estudio se continuó con los 22 aislamientos de *S. hominis*, de los cuales 21 fueron aislados de sangre y 1 de LCR.

Tabla 6. Resultados de la identificación de los aislamientos de ECN

Nº aislamientos	Identificación de acuerdo a:			ID definitiva
	API Staph	16S rRNA	<i>tuf</i>	
56	<i>S. epidermidis</i>	ND	ND	
10	<i>S. haemolyticus</i>	ND	ND	
4	<i>S. cohnii</i>	ND	ND	
2	<i>S. xylosum</i>	ND	ND	
1	<i>S. sciurii</i>	ND	ND	
1	<i>S. capitis</i>	ND	ND	
1	<i>S. lentus</i>	ND	ND	
1	<i>S. chromogenes</i>	ND	ND	
1	<i>S. lugdunensis</i>	ND	ND	
1	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
3	<i>S. hominis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
20	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	ND	<i>S. hominis</i>
2	<i>S. hominis</i>	<i>S. xylosum/ S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>

ND: no determinado

Para la identificación definitiva de *S. hominis* se tomó como parámetro la concordancia entre la identificación bioquímica y la identificación por un método molecular.

5.2 Caracterización de *S. hominis* por EGCP

La enzima *XhoI* generó un perfil de bandas entre 9 y 14 fragmentos de restricción (figura 4a). En base a los patrones de restricción se generó un dendograma en el que se observó que el porcentaje de similitud entre los aislamientos, fue entre un 0% y 95% (figura 4c). Se presentaron 22 patrones de restricción diferentes, por lo tanto no se detectó la presencia de clonas. En base a estos resultados se decidió continuar con el estudio incluyendo el total de los aislamientos.

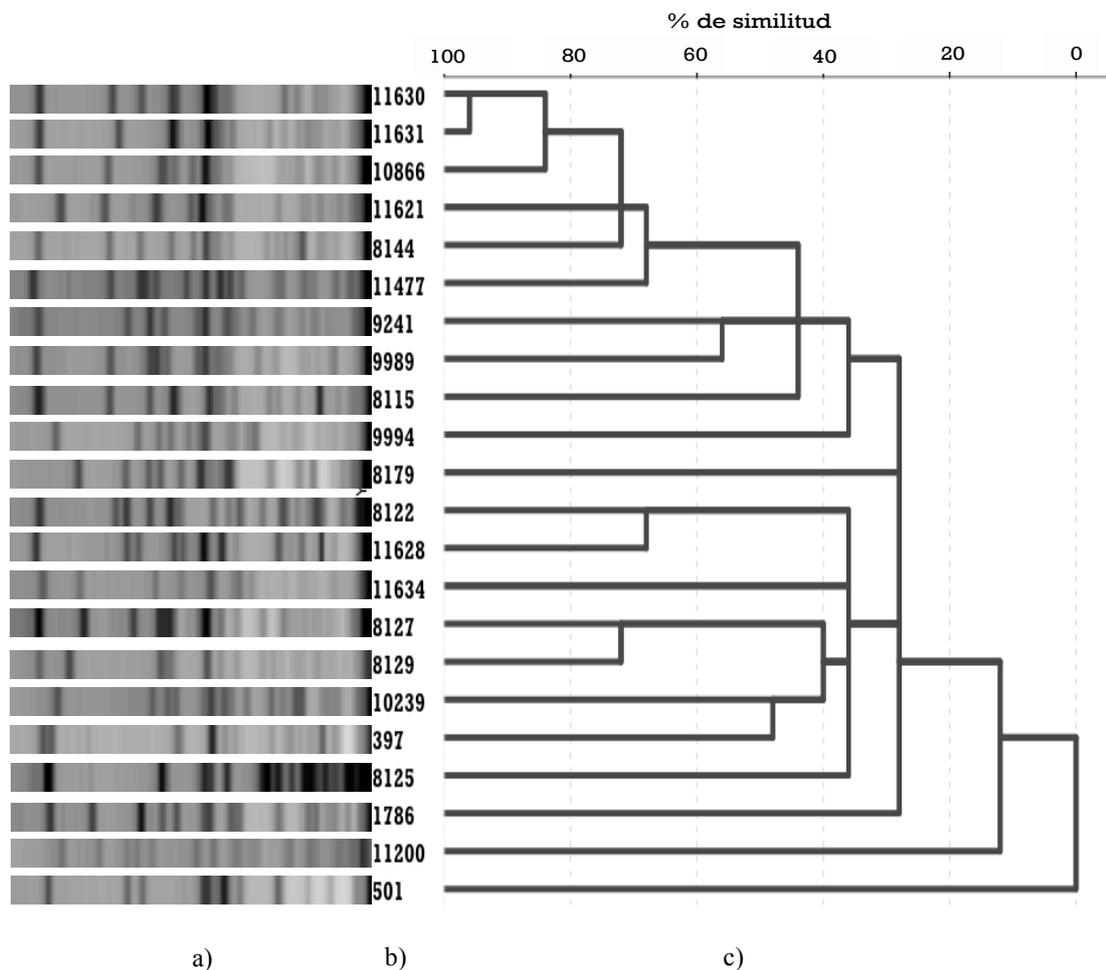


Figura 7. Resultado de la determinación de clonas por EGCP. A) Imágenes del gel de EGCP que muestra los patrones de bandas después de la digestión con la enzima *XhoI*, b) número de aislamiento, c) dendograma generado por el software SPSS® versión 20 utilizando el método de conglomeración del vecino más próximo con la medida binaria de Jaccard.

5.3 Fenotipo de resistencia de *S. hominis*

Se determinó que de los 22 aislamientos, 18 mostraron resistencia fenotípica a oxacilina de acuerdo a la prueba de cefoxitina (30 µg), mediante el método de difusión en disco. Tres de los cuatro aislamientos que resultaron susceptibles a oxacilina, presentaron resistencia a los antibióticos β-lactámicos. El 95% (21/22) de los aislamientos fueron resistentes al menos a cinco antibióticos evaluados por el método de microdilución en caldo, incluidos los β-lactámicos (tabla 7). No se detectó resistencia a linezolid ni a vancomicina. La CMI de cada antibiótico, así como los porcentajes de resistencia se muestran en la tabla 8.

No se observó correlación entre los resultados del fenotipo de resistencia a los antibióticos con la caracterización molecular por EGCP.

Tabla 7. Resultados de la determinación de resistencia a oxacilina y perfil de resistencia a los antibióticos

Aislamiento	Susceptibilidad a oxacilina	Perfil de resistencia a los antibióticos
397	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, TMP, RIF, GEN
501	S	PEN, AMP, AUG, ERY, CIP
1786	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, CIP, NIT, CTX, TMP, CHL, RIF, GEN, DAP
8115	R	PEN, AMP, AUG, ERY, CIP, TMP, CHL
8122	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, CIP, TMP, CHL
8125	S	PEN, AMP, AUG, ERY, TMP
8127	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, DAP
8129	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, GEN
8144	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, CIP, TMP
8179	R	PEN, AMP, AUG, TMP, CHL, DAP
9241	S	ERY
9989	R	PEN, AMP, AUG, ERY, CIP, TMP, CHL
9994	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TMP, CHL, GEN
10239	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, TMP
10866	R	PEN, AMP, AUG, ERY, CIP, TMP, DAP
11200	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, CIP, NIT, TMP, RIF, DAP
11477	S	PEN, AMP, AUG, ERY, DAP
11621	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TMP, CHL, DAP
11628	R	PEN, AMP, AUG, ERY, CIP, TMP, GEN, DAP
11630	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, CIP, TMP, GEN
11631	R	PEN, AMP, AUG, ERY, TET, CIP, CTX, TMP, CHL, RIF, GEN, DAP
11634	R	PEN, AMP, AUG, ERY, DAP

PEN: penicilina, AMP: ampicilina, AUG: amoxicilina-ácido clavulánico, ERY: eritromicina, TMP: trimetoprim, CIP: ciprofloxacino, TET: tetraciclina, DAP: daptomicina, CHL: cloranfenicol, GEN: gentamicina, RIF: rifampicina, NIT: nitrofurantoina, CTX: cefotaxima, VAN: vancomicina, LZD: linezolid

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria y porcentaje de resistencia de cada antibiótico evaluado por el método de microdilución en caldo para los 22 aislamientos.

Antibiótico	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)	Rango (µg/mL)	Resistencia n (%)
PEN	>1	>1	<0.125 - >1	21 (95)
AMP	>1	>1	<0.125 - >1	21 (95)
AUG	>16/8	>16/8	4/8 - >16/8	21 (95)
ERY	8	>32	4 - >16	21 (95)
TMP	>32	>32	<2 - >32	17 (77)
CIP	2	>8	<0.125 - >8	11 (50)
TET	8	>32	<1 - >32	10 (45)
DAP	1	>8	<0.25 - >8	10 (45)
CHL	8	>64	4 - >64	8 (36)
GEN	4	16	<1 - >32	7 (32)
RIF	<0.25	4	<0.25 - >8	4 (18)
NIT	16	64	16 - >256	2 (9)
CTX	8	32	<1 - >64	2 (9)
VAN	1	16	<0.5 - 16	0
LZD	2	2	<1 - 2	0

PEN: penicilina, AMP: ampicilina, AUG: amoxicilina-ácido clavulánico, ERY: eritromicina, TMP: trimetoprim, CIP: ciprofloxacino, TET: tetraciclina, DAP: daptomicina, CHL: cloranfenicol, GEN: gentamicina, RIF: rifampicina, NIT: nitrofurantoina, CTX: cefotaxima, VAN: vancomicina, LZD: linezolid

5.4 Tipificación del SCC_{mec} de *S. hominis*

En la tipificación de los 22 aislamientos por las metodologías de Kondo y Zhang, el 81.8% (18/22) de los aislamientos presentaron el gen *mecA*, lo cual se demostró por ambas metodologías (tabla 9). Los resultados de la tipificación por la metodología de Kondo mostraron datos incompletos para la determinación de los tipos de complejos recombinasa y *mec*, debido a que sólo en la primer PCR múltiple se presentaron amplificaciones, las cuales correspondieron al gen *mecA* y a los alelos *ccrA1-ccrB*, *ccrA2-ccrB*, *ccrA3-ccrB* y *ccrA4-ccrB4* de los casetes tipo I.1, II.1, III.1 y VI respectivamente. Por lo anterior, no es válido inferir los tipos de elementos estructurales del casete a partir de los resultados obtenidos por la metodología de

Kondo. Por otro lado, los resultados de la tipificación por el método de Zhang proporcionaron datos sobre los tipos de complejos genéticos básicos del casete, en los cuales se mostró que de los 18 aislamientos que presentaron el gen *mecA*, ocho fueron no tipificables, debido a que no amplificaron para ningún complejo *ccr*. Sólo un aislamiento mostró la estructura correspondiente al casete tipo III de *S. aureus*. Nueve aislamientos presentaron una estructura diferente a las descritas en *S. aureus*: dos aislamientos mostraron casete tipo III, complejo *mecA* clase A, complejo *ccr* tipo 1; cuatro aislamientos, casete tipo III, complejo *mecA* clase A, complejo *ccr* tipo 1 y 5; un aislamiento, casete tipo III, complejo *mecA* clase A, complejo *ccr* tipo 5; un aislamiento casete tipo III y IVb, complejo *mecA* clase A, complejo *ccr* 1 y 5; un aislamiento casete tipo III, IVa y IVb, complejo *mecA* clase B, complejo *ccr* tipo 5 (tabla 9). Tomando como base estos resultados, se seleccionaron los aislamientos 397, 8115 y 10239 como candidatos a un nuevo casete, debido a que presentaron la mayor discrepancia con los casetes descritos para *S. aureus*.

Tabla 9. Resultado de la tipificación molecular del SCCmec

Aislamiento	Tipo SCCmec (Zhang)	Complejo mec (Zhang)	Complejo ccr (Zhang)	Tipo de SCCmec (Kondo)	Tipo de estructura del SCCmec
397	III, IVb	A	1 + 5	I.1 + II.1	nuevo
501	-	-	-	-	NP
1786	IVa	B	-	II.1 + VI	NT
8115	III	A	1 + 5	I.1 + II.1	nuevo
8122	III	A	1 + 5	II.1	nuevo
8125	-	-	-	-	NP
8127	III	A	-	I.1 + II.1	NT
8129	III	A	1	II.1	nuevo
8144	III	A	-	II.1	NT
8179	III	A	3	I.1 + II.1	Tipo III de <i>S. aureus</i>
9241	-	-	-	-	NP
9989	III	A	1	I.1 + II.1 + VI	nuevo
9994	III	A	5	II.1	nuevo
10239	III, IVa, IVb	B	5	II.1	nuevo
10866	III	A	-	II.1	NT
11200	IVa	B	-	III.1	NT
11477	-	-	-	-	NP
11621	III	A	-	II.1	NT
11628	III	A	-	II.1	NT
11630	III	A	1 + 5	II.1	nuevo
11631	III	A	1 + 5	II.1	nuevo
11634	III	A	-	II.1	NT

NP: no presenta, NT: no tipificable

5.5 Elucidación teórica de la estructura del SCCmec de *S. hominis*

Después del análisis de los resultados obtenidos de la tipificación molecular del SCCmec y del fenotipo de resistencia, se determinó lo siguiente:

- El aislamiento 397, presentó el complejo *mec* clase A compuesto por *IS431-mecA-mecRI-mecI*, complejo *ccr* tipo 1 compuesto por los alotipos *A1B1*. Con la presencia del gen *ccrC*, la amplificación para el casete tipo III y la asociación que ambos elementos tienen con la estructura del SCCHg, se dedujo la presencia del gen *mer*. En base a su resistencia fenotípica hacia la eritromicina, tetraciclina y gentamicina, así como a la asociación de ésta con los genes *ermA*, *tet*, y *aacA-aphD* respectivamente, se asumió la presencia de

los elementos móviles Tn554, pT181 y Tn4001 (figura 8a). Por lo anterior, el casete de este aislamiento presenta aproximadamente un 75% de los elementos descritos para en el casete tipo III de *S. aureus*. No se pudo determinar asociación entre los elementos genéticos encontrados y la amplificación que este aislamiento presentó para el casete tipo IVb.

- El aislamiento 8115, presentó el mismo complejo *mec*, *ccr*, gen *mer* y Tn554 que el aislamiento 397; sin embargo, éste no presentó resistencia fenotípica a tetraciclina y gentamicina, por lo tanto no hubo asociación con los elementos pT181 y Tn4001 (figura 8b). Por lo anterior, el casete de este aislamiento presenta aproximadamente un 62.5% de los elementos descritos para en el casete tipo III de *S. aureus*.
- El aislamiento 10239, presentó el complejo *mec* clase B compuesto por *IS431-mecA-ΔmecR1-IS1272*, complejo *ccr* tipo 5. Debido a que sólo se presentó la recombinasa *ccrC*, se tomó como base de la estructura básica el casete tipo V de *S. aureus*. De igual manera que en el aislamiento 397 se dedujo la presencia del gen *mer* y de los elementos móviles Tn554, pT181, Tn4001 en relación a la resistencia fenotípica (figura 8c). Por lo anterior, el casete de éste aislamiento presenta aproximadamente un 75% de los elementos descritos para en el casete tipo III de *S. aureus*. No se pudo determinar asociación entre los elementos genéticos encontrados y la amplificación que este aislamiento presentó para el casete tipo IVa y IVb.

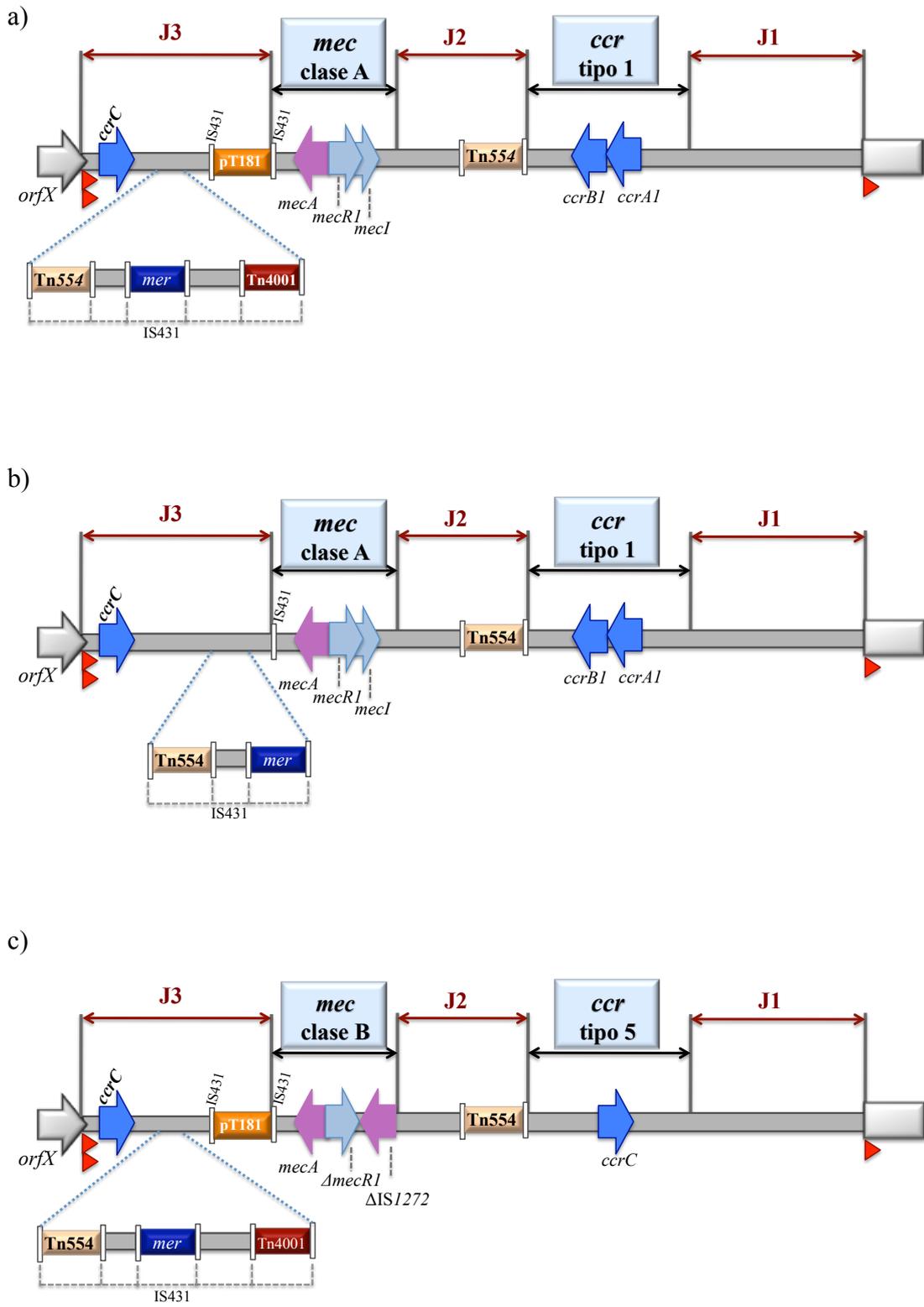


Figura 8. Estructuras teóricas de un nuevo SCCmec de *S. hominis*. a) Aislamiento 397, b) aislamiento 8115, aislamiento 10239

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

En base a lo reportado previamente por algunos autores, respecto a la mala identificación de los ECN a nivel especie con algunos sistemas bioquímicos ([24](#), [25](#), [28](#)); en este trabajo se decidió emplear además del sistema API Staph, el cual ha sido clasificado como uno de los más acertados, un método molecular que incluyó la amplificación parcial de las secuencias 16S rRNA y *tuf*, por ser las que permiten una mayor discriminación entre las especies de este grupo ([23](#), [30](#)). De esta manera, con la concordancia entre ambos métodos se aumentó la exactitud de la identificación y se aseguró un estudio que incluyera aislamientos exclusivamente de la especie *S. hominis*. En los resultados obtenidos por sistema API Staph, de los 103 aislamientos procesados fue posible detectar sólo cuatro mal identificados como *S. hominis*, de los cuales, uno fue identificado definitivamente como *S. epidermidis* y tres como *S. haemolyticus*, lo cual no difiere con lo reportado en algunos estudios, debido a que entre estas tres especies existe una similitud alta en la asimilación de carbohidratos. En cuanto a la identificación molecular por la secuencia 16S rRNA se encontraron dos aislamientos de *S. hominis* mal identificados como *S. xylosum* (98%) /*S. hominis* (95%), debido a que en la secuencia amplificada de este gen existe una homología alta entre estas dos especies, de acuerdo a lo reportado por Heikens y cols en 2005 ([30](#)). Otro hallazgo que coincide con los resultados de estudios previos, es la distribución de especies encontrada en este trabajo, en donde *S. epidermidis*

representa la especie más frecuente dentro de los ECN, y tanto *S. hominis* como *S. haemolyticus* se encuentran dentro de las tres especies aisladas con mayor frecuencia de sangre, espécimen de donde provienen la mayoría de los aislamientos incluidos en este estudio ([17](#), [35](#)).

Para la detección de clonas se empleó la técnica de EGCP del protocolo para *S. aureus*; sin embargo, debido a la que los ensayos con la enzima *SmaI* durante el trabajo experimental no generaban un patrón de más de cinco bandas y también de acuerdo con estudios previos donde se reportó que *S. hominis* no podía caracterizarse por este método, se decidió trabajar con las modificaciones sugeridas para esta especie ([11](#)). En la caracterización por EGCP no se encontró clonalidad entre los aislamientos, y esto coincide con lo reportado en el único trabajo sobre la epidemiología molecular de *S. hominis* ([61](#)). Este resultado es contrario a lo que se esperaría partiendo del hecho de que ésta especie esta asociada a infecciones nosocomiales y a que los aislamientos provienen sólo de dos hospitales. Los aislamientos incluidos en este trabajo fueron recolectados en un período de cinco años (2006-2011), por lo que la diseminación de clonas durante este tiempo no sucedió. Por otro lado, tomando en cuenta que *S. hominis* forma parte de la flora normal de humanos, los resultados obtenidos sugieren que las infecciones causadas en los pacientes fueron originadas de manera endógena y no por diseminación cruzada dentro del hospital. En base a que los patrones de restricción fueron diferentes entre sí, se decidió incluir el total de los aislamientos en el resto del estudio.

Aunque la finalidad de emplear la técnica de EGCP fue detectar clonas para seleccionar los aislamientos con lo que continuaría el trabajo, es importante enfatizar

que uno de los ejes principales que soportan la línea de investigación sobre el estudio del SCC mec es la resistencia hacia los antibióticos, y es por esto que es necesario distinguir entre la propagación de las cepas resistentes (clonas) y la propagación de los genes de resistencia (transferencia horizontal). Por lo anterior, con los resultados obtenidos podemos deducir que los aislamientos incluidos en este estudio, tienen genes de resistencia que no fueron adquiridos por propagación clonal y sí probablemente por transferencia horizontal.

En relación a los resultados obtenidos en la determinación de resistencia a meticilina, se encontraron cuatro aislamientos susceptibles, mismos que no presentaron el gen *mecA*, por lo tanto este método fenotípico fue útil en la detección de este gen. Sin embargo, de estos aislamientos susceptibles, tres presentaron resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Este hecho sugiere que la resistencia a esta clase de fármacos en estos tres aislamientos, es originada por un mecanismo diferente al producido por la proteína PBP2a, tal como el aumento en la permeabilidad de la pared celular por la disminución en la expresión de porinas y/o la hidrólisis enzimática por la producción de betalactamasas.

Los valores altos de CMI, así como los porcentajes de resistencia elevados a penicilina, eritromicina, tetraciclina, amoxicilina/ácido clavulánico y trimetoprim, encontrados en los aislamientos incluidos, representa un hallazgo frecuente entre las especies de los ECN y en general en otros Gram positivos, sobre todo en los de procedencia nosocomial, debido a que estos antimicrobianos no son de reciente introducción en la práctica clínica y años atrás comenzaron a reportarse cepas resistentes a éstos. La resistencia a múltiples fármacos entre los aislamientos de *S. hominis* de este estudio, puede ser consecuencia de los períodos largos de

internamiento y a la terapia antibiótica agresiva y continua, a la cual son sometidos los pacientes hospitalizados. Esto puede convertir a esta especie en un depósito de resistencia y donador de ésta para otras especies que comparten el mismo nicho ecológico, como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. aureus*, entre otros.

Resulta interesante ver que los aislamientos presentan diversidad genética alta, y de igual manera una diversidad alta en su fenotipo de resistencia, incluso en los que no se presentó el gen *mecA*. Esto sugiere que la propagación de genes de resistencia está en incremento, y que su transferencia es independiente a la de otros genes, lo cual tiene sentido si los resultados obtenidos se contextualizan en el marco de la selección natural, en donde sólo las bacterias con variantes capaces de resistir la presencia de concentraciones altas de antibióticos, serán aptas para la supervivencia en el organismo donde se encuentren, y entonces el antibiótico se vuelve el primer factor de selección.

Aunque entre los aislamientos estudiados no se detectó resistencia a los denominados antimicrobianos de último recurso, como vancomicina o linezolid, los resultados de este trabajo contribuyen a evidenciar que nuestro país se encuentra inmerso en la problemática de la resistencia antimicrobiana, a consecuencia probablemente del uso indiscriminado de antibióticos y a la producción fármacos de mala calidad (86). Otro factor importante a considerar respecto al desarrollo de la resistencia antimicrobiana a nivel mundial, es que el interés científico, haya enfocado sus prioridades sobre las bacterias patógenas, subestimando lo que podría ocurrir con las de baja virulencia, como *S. hominis*. Mientras tanto, esta porción “inofensiva” de la población bacteriana de los organismos animales y humanos ha seguido actuando

como reservorio de resistencia, de esta manera hoy en día estos microorganismos emergen como patógenos oportunistas de difícil tratamiento antimicrobiano (87).

Los resultados de la tipificación del casete por el método de Zhang, mostraron hallazgos interesantes, uno es que se encontraron ocho aislamientos no tipificables en donde no se identificó ningún tipo de *ccr*, esto a pesar que amplificaron para los casete tipo III y IV. Esto podría deberse a varias razones: 1) las *ccr* presentes en los aislamientos no tipificables, no son reconocidas debido a que se encuentran distanciadas de *ccrAB* y *ccrC*, es decir, que se tratan de un tipo de *ccr* diferente y que no están relacionadas genéticamente con las ya descritas; 2) una tasa alta de mutación en la secuencia de unión de los iniciadores de *ccr* utilizados para *S. aureus*; 3) recombinación homóloga entre los genes *ccr* que podrían generar nuevos isotipos que no son detectables por las PCR's establecidas para la tipificación; 4) que se trate de un casete en el cual los genes *ccr* fueron eliminados debido a que el gen *mecA* se transfirió de manera independiente (56). Contrario a lo anterior, se encontraron cinco aislamientos que presentaron una combinación de dos tipos de complejos recombinasa, *ccrABI* + *ccrC*; lo cual puede indicar la existencia de un casete con dos tipos de complejos *ccr* o un SCC*mec* en tandem con un SCC no-*mec*. Estos resultados coinciden con lo reportado en algunos trabajos (11, 51-53, 61, 67).

La proporción de aislamientos considerados como no tipificables o con nuevo casete, es mayor en este trabajo que en el reportado por Boucham y cols. en 2011, en donde el 33.3% de los aislamientos presentaron una estructura de SCC*mec* tipificable a diferencia de este estudio donde sólo el 4.5% de los aislamiento presentó el casete tipo III. Las razones de esta discrepancia podrían ser debidas a los diferentes especímenes clínicos incluidos en cada trabajo, a la patología del paciente o

predilección geográfica; sin embargo para sustentar estos hechos serían necesarios más estudios sobre la epidemiología molecular de *S. hominis* en todo el mundo.

Estudios previos donde se caracterizó el SCCmec de *S. hominis* mostraron igual que en este trabajo, que esta especie es acarreadora predominantemente del complejo *mec* clase A y del complejo recombinasa tipo *ccrABI* (55, 61, 67). Tomando en cuenta la hipótesis de que transferencia del SCCmec fue de los ECN hacia *S. aureus*, este hecho sugiere que *S. hominis* es un reservorio de dichos elementos, y que podría haber sido el donante de estos componentes para el ensamblaje de los casetes tipo I, II, III, VIII y IX.

Los resultados obtenidos en la tipificación del casete por el método de Kondo, en donde sólo se detectaron amplificaciones en la primer PCR, ponen de manifiesto la inminente necesidad de estudiar cada especie de los ECN de manera individual y que puedan desarrollarse estrategias adecuadas para la tipificación del SCCmec de cada especie. Las metodologías utilizadas en este estudio sólo se basan en los datos de PCR para los dos elementos centrales del casete (complejo *ccr* y complejo *mec*), y aunque en *S. aureus* se considera ser un enfoque válido, para las especies de ECN la distribución y la estructura SCCmec sigue siendo difícil de alcanzar y se debe tener cuidado en la interpretación de los datos; es decir, que no podemos asegurar que algún elemento del casete no está presente solo por no observar su amplificación, ya se necesita asimilar que los iniciadores de estas metodologías fueron creados a partir de las secuencias de interés en *S. aureus*, y que una especie diferente por más emparentada genéticamente que ésta sea, puede existir una tasa alta de mutación en las regiones de unión con los iniciadores. Otra limitación de los métodos utilizados es que no tienen en consideración la proximidad

de los dos elementos básicos en el cromosoma. A pesar que las conclusiones adoptadas son las más razonables, no se puede afirmar que los elementos estructurales encontrados se localicen de igual manera que en el casete descrito para *S. aureus*. Por lo anterior, sólo los datos obtenidos por la metodología de Zhang fueron analizados y tomados en cuenta para la selección de los aislamientos candidatos a un nuevo SCC*mec*.

Los aislamientos que se proponen con estructuras de SCC*mec* diferentes a las descritas para *S. aureus*, se asociaron con genes de resistencia a otros antibióticos, y aunque estos genes no fueron detectados por PCR, se asume su probable presencia en base a que presentaron amplificación para el casete tipo III, por lo que se infiere cierta similitud con la estructura de este SCC*mec*. Los tres aislamientos presentaron resistencia a eritromicina y el mecanismo de resistencia de este antibiótico está asociado al gen *ermA* el cual reside dentro del elemento móvil Tn554, que a su vez ha sido descrito dentro del casete tipo III de *S. aureus*, por lo tanto se propone la presencia de este elemento dentro los nuevos casetes. La resistencia a tetraciclina y gentamicina se asocian a la presencia de los genes *tet* y *aacA-aphD* respectivamente, los cuales residen dentro de los elementos pT181 y Tn4001, mismos que han sido descritos en el casete tipo III y IVc respectivamente, por lo que se propone la presencia de estos elementos en los cuales se observó esta resistencia.

Los datos respecto a las nuevas estructuras, deben ser confirmados por secuenciación, y de esta manera se podrán establecer los nuevos tipos de SCC*mec* con la información completa de los elementos que contiene y de la proximidad entre sí. Además con esto se podría detectar la presencia de genes de resistencia que incluso no estén expresados y que en determinado momento pudieran transcribirse.

Los resultados de este estudio, en conjunto con lo reportado en los trabajos donde se describen elementos de casete diferentes en las especies de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii* ([68](#), [88](#), [89](#)), contribuyen a demostrar que los ECN presentan una gran frecuencia y diversidad del SCC*mec*, y que además podrían contener elementos que aun no han sido encontrados en *S. aureus*. Por lo tanto, es necesario investigar cada especie por separado, para lograr avance en el entendimiento del desarrollo de la resistencia antimicrobiana, así como sus mecanismos de acción.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1. Se observó una clonalidad baja y sin relación al fenotipo de resistencia a los antibióticos ni a la presencia de elementos del SCC*mec*.
2. Los aislamientos presentaron resistencia alta a penicilina, ampicilina, oxacilina, eritromicina, amoxicilina-ácido clavulánico y trimetoprim (>77%).
3. Se detectó una frecuencia alta (>81%) del gen *mecA*
4. El complejo de genes *mecA* clase A y complejo de genes *ccr* tipo 1 y 5 fueron los más frecuentes.
5. Sólo un aislamiento presentó la estructura correspondiente al casete tipo III descrito para *S. aureus*
6. Se detectaron tipos de SCC*mec* no tipificables por los métodos establecidos para *S. aureus*, y combinaciones nuevas de sus elementos estructurales.
7. Los resultados sugieren que *S. hominis* podría ser un reservorio de complejos de genes recombinasa tipo *ccrABI*, *ccrCI* y de complejos genéticos *mec* clase A para ensamblaje de los SCC*mec* encontrados en *S. aureus*.
8. Se propone la estructura de 3 nuevos SCC*mec* para *S. hominis*, los cuales presentan entre 62.5% y 75% de elementos descritos para el casete tipo III de *S. aureus*.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

1. Casey, A.L., P.A. Lambert, and T.S. Elliott, *Staphylococci*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **29 Suppl 3**: p. S23-32.
2. Rogers, K.L., P.D. Fey, and M.E. Rupp, *Coagulase-negative staphylococcal infections*. Infect Dis Clin North Am, 2009. **23**(1): p. 73-98.
3. Euzéby, J.P., *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet*. Int J Syst Bacteriol, 1997. **47**(2): p. 590-2.
4. Kloos, W.E. and K.H. Schleifer, *Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin*
- II. *Descriptions of Four New Species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus simulans*. Int J Syst Bacteriol, 1975. **25**(1): p. 62-79.
5. Kloos, W.E., *Natural populations of the genus Staphylococcus*. Annu Rev Microbiol, 1980. **34**: p. 559-92.
6. Kloos, W.E., et al., *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures*. Int J Syst Bacteriol, 1998. **48 Pt 3**: p. 799-812.
7. Huebner, J. and D.A. Goldmann, *Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens*. Annu Rev Med, 1999. **50**: p. 223-36.
8. Christensen, G.D., et al., *Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(6): p. 996-1006.
9. Stewart, P.S. and J.W. Costerton, *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. Lancet, 2001. **358**(9276): p. 135-8.
10. Davey, M.E. and A. O'Toole G, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 847-67.
11. Garza-Gonz Lez, E., et al., *Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of Staphylococcus cohnii, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus sciuri*. Scand J Infect Dis, 2011. **43**(11-12): p. 930-6.
12. de Allori, M.C., et al., *Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative Staphylococcus strains*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(8): p. 1592-6.

13. Fleer, A. and J. Verhoef, *New aspects of staphylococcal infections: emergence of coagulase-negative staphylococci as pathogens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1984. **50**(5-6): p. 729-44.
14. Sarvikivi, E., et al., *Nosocomial bloodstream infections in children: an 8-year experience at a tertiary-care hospital in Finland*. *Clin Microbiol Infect*, 2008. **14**(11): p. 1072-5.
15. Chu, V.H., et al., *Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: report of 99 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database*. *Clin Infect Dis*, 2004. **39**(10): p. 1527-30.
16. Hidron, A.I., et al., *NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. **29**(11): p. 996-1011.
17. Al Wohoush, I., et al., *Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci*. *Clin Microbiol Infect*, 2011. **17**(4): p. 569-71.
18. Chaves, F., et al., *Nosocomial spread of a Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(9): p. 4877-9.
19. d'Azevedo, P.A., et al., *Outbreak of Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus bloodstream infections in Sao Paulo city, Brazil*. *J Med Microbiol*, 2008. **57**(Pt 2): p. 256-7.
20. Palazzo, I.C., et al., *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil*. *J Antimicrob Chemother*, 2008. **62**(6): p. 1222-6.
21. Cunha, B.A., M.D. Esrick, and M. Larusso, *Staphylococcus hominis native mitral valve bacterial endocarditis (SBE) in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy*. *Heart Lung*, 2007. **36**(5): p. 380-2.
22. Iyer, M.N., et al., *Staphylococcus hominis endophthalmitis associated with a capsular hypopyon*. *Am J Ophthalmol*, 2005. **139**(5): p. 930-2.
23. Garza-Gonzalez, E., et al., *Evaluation of Sensititre plates for identification of clinically relevant coagulase-negative staphylococci*. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(3): p. 963-5.
24. Layer, F., et al., *Comparative study using various methods for identification of Staphylococcus species in clinical specimens*. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(8): p. 2824-30.
25. Brigante, G., et al., *Identification of coagulase-negative Staphylococci by using the BD phoenix system in the low-inoculum mode*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(11): p. 3826-8.
26. Gilad, J. and D. Schwartz, *Identification of Staphylococcus species with the VITEK 2 system: the case of Staphylococcus hominis*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(2): p. 685; author reply 685-6.
27. Martineau, F., et al., *Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels*. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(7): p. 2541-7.
28. Mellmann, A., et al., *Sequencing and staphylococci identification*. *Emerg Infect Dis*, 2006. **12**(2): p. 333-6.
29. Ghebremedhin, B., et al., *Genetic classification and distinguishing of Staphylococcus species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(3): p. 1019-25.

30. Heikens, E., et al., *Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2286-90.
31. Koksai, F., H. Yasar, and M. Samasti, *Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey*. Microbiol Res, 2009. **164**(4): p. 404-10.
32. Mulanovich, V.E., et al., *Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative Staphylococcus in a cancer centre linked to increased linezolid utilization*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(9): p. 2001-4.
33. Fitzgibbon, J.E., et al., *A sequence variant of Staphylococcus hominis with a high prevalence of oxacillin and fluoroquinolone resistance*. Res Microbiol, 2001. **152**(9): p. 805-10.
34. Petinaki, E., et al., *Emergence of Staphylococcus hominis strains expressing low-level resistance to quinupristin/dalfopristin in Greece*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(5): p. 811-2.
35. Ruiz de Gopegui, E., et al., *[Nosocomial spread of linezolid-resistant Staphylococcus hominis in two hospitals in Majorca]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2011. **29**(5): p. 339-44.
36. Sorlozano, A., et al., *Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility Staphylococcus hominis subspecies hominis circulating in an intensive care unit*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(1): p. 73-80.
37. Ito, T. and K. Hiramatsu, *[Genetics of multiresistant MRSA]*. Nihon Rinsho, 1997. **55**(5): p. 1200-5.
38. Ito, T. and K. Hiramatsu, *Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Yonsei Med J, 1998. **39**(6): p. 526-33.
39. Gomes, A.R., H. Westh, and H. de Lencastre, *Origins and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal lineages*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3237-44.
40. Sola, C., et al., *Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(1): p. 192-200.
41. Tsubakishita, S., et al., *Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(10): p. 4352-9.
42. Deurenberg, R.H., et al., *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(3): p. 222-35.
43. Archer, G.L. and D.M. Niemeyer, *Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci*. Trends Microbiol, 1994. **2**(10): p. 343-7.
44. Wu, S., et al., *Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of mecA from a methicillin susceptible strain of Staphylococcus sciuri*. Microb Drug Resist, 1996. **2**(4): p. 435-41.
45. Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu, *Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(6): p. 1449-58.

46. Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu, *A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(6): p. 1549-55.
47. Katayama, Y., H.Z. Zhang, and H.F. Chambers, *PBP 2a mutations producing very-high-level resistance to beta-lactams*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(2): p. 453-9.
48. Pinho, M.G., H. de Lencastre, and A. Tomasz, *An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10886-91.
49. Pinho, M.G., et al., *Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(22): p. 6525-31.
50. Garza-Gonzalez, E., et al., *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting*. *Epidemiol Infect*, 2010. **138**(5): p. 645-54.
51. Garza-Gonzalez, E., et al., *Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance*. *J Med Microbiol*, 2010. **59**(Pt 3): p. 323-9.
52. Ibrahim, S., et al., *Carriage of methicillin-resistant Staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility*. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(1): p. 32-7.
53. Mombach Pinheiro Machado, A.B., et al., *Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil*. *J Med Microbiol*, 2007. **56**(Pt 10): p. 1328-33.
54. Zong, Z., C. Peng, and X. Lu, *Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20191.
55. Hanssen, A.M., G. Kjeldsen, and J.U. Sollid, *Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant Staphylococcus aureus and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?* *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(1): p. 285-96.
56. Hanssen, A.M. and J.U. Ericson Sollid, *SCCmec in staphylococci: genes on the move*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006. **46**(1): p. 8-20.
57. Bouchami, O., et al., *High prevalence of mec complex C and ccrC is independent of SCCmec type V in Staphylococcus haemolyticus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011.
58. Jamaluddin, T.Z., et al., *Extreme genetic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strains disseminated among healthy Japanese children*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(11): p. 3778-83.
59. Ruppe, E., et al., *Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus strains among outpatients from four countries*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(2): p. 442-9.
60. Soderquist, B. and C. Berglund, *Methicillin-resistant Staphylococcus saprophyticus in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)*. *Clin Microbiol Infect*, 2009. **15**(12): p. 1176-8.

61. Bouchami, O., et al., *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus hominis (MRSHo): low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21940.
62. Ito, T., K. Kuwahara, and K. Hiramatsu, *Staphylococcal cassette chromosome mec(SCC mec) analysis of MRSA*. Methods Mol Biol, 2007. **391**: p. 87-102.
63. IWG-SCC. *SCCmec Background*. 2008; Available from: <http://www.sccmec.org/>, <http://www.staphylococcus.net/>.
64. Oliveira, D.C. and H. de Lencastre, *Methicillin-resistance in Staphylococcus aureus is not affected by the overexpression in trans of the mecA gene repressor: a surprising observation*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23287.
65. Ito, T., et al., *Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(7): p. 2637-51.
66. IWG-SCC, *Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(12): p. 4961-7.
67. Hanssen, A.M. and J.U. Sollid, *Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci from Norway*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(5): p. 1671-7.
68. Urushibara, N., et al., *Analysis of Staphylococcal cassette chromosome mec in Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus sciuri: identification of a novel ccr gene complex with a newly identified ccrA allotype (ccrA7)*. Microb Drug Resist, 2011. **17**(2): p. 291-7.
69. Oliveira, D.C., et al., *CcrB typing tool: an online resource for staphylococci ccrB sequence typing*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(4): p. 959-60.
70. Chongtrakool, P., et al., *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(3): p. 1001-12.
71. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: 'SCCmec IV multiplex'*. J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(1): p. 42-8.
72. Turlej, A., W. Hryniewicz, and J. Empel, *Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview*. Pol J Microbiol, 2011. **60**(2): p. 95-103.
73. Ito, T., et al., *Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(5): p. 1323-36.
74. Oliveira, D.C. and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(7): p. 2155-61.
75. Zhang, K., et al., *Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 5026-33.

76. Kondo, Y., et al., *Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(1): p. 264-74.
77. Hota, B., et al., *Formulation of a model for automating infection surveillance: algorithmic detection of central-line associated bloodstream infection*. *J Am Med Inform Assoc*, 2010. **17**(1): p. 42-8.
78. Salud, S.d., *Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-045-SSA2-2004, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales, 2004*, Diario Oficial de la Federación: México.
79. Pei, Z., et al., *Bacterial biota in the human distal esophagus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(12): p. 4250-5.
80. Murchan, S., et al., *Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(4): p. 1574-85.
81. Chung, M., et al., *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains*. *Microb Drug Resist*, 2000. **6**(3): p. 189-98.
82. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
83. CLSI, *M02-A11. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition*, 2012.
84. CLSI, *M07-A9 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*, C.a.L.S. Institute, Editor 2012.
85. CLSI, *M100-S22. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*, 2012.
86. Amabile-Cuevas, C., *Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes*. *J Infect Dev Ctries*, 2010. **4**(3): p. 126-31.
87. Prescott, L.M., *Highlights of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*. *Body Posit*, 2002. **15**(3): p. 6-9.
88. Zong, Z. and X. Lu, *Characterization of a new SCCmec element in Staphylococcus cohnii*. *PLoS One*, 2010. **5**(11): p. e14016.
89. Pi, B., et al., *Distribution of the ACME-arcA gene among methicillin-resistant Staphylococcus haemolyticus and identification of a novel ccr allotype in ACME-arcA-positive isolates*. *J Med Microbiol*, 2009. **58**(Pt 6): p. 731-6.

APÉNDICE A

PRUEBAS PRIMARIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *S. hominis*

Tinción de Gram

Se colocó una gota de solución salina estéril sobre la superficie de un portaobjetos limpio y seco, con un asa bacteriológica se transfirió una colonia a la solución salina y este inóculo se homogenizó, extendió y se dejó secar a temperatura ambiente. La preparación se fijó por calor y enseguida se cubrió con cristal violeta por un minuto y se enjuagó con agua, después se aplicó lugol, se dejó por un min y se enjuagó con agua, se decoloró con una mezcla de alcohol-acetona 70:30 por 5 s, se enjuagó con agua y se agregó safranina durante 1 min, se enjuagó con agua, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se observó al microscopio con los objetivos 40X y 100X.

Producción de catalasa. Prueba en portabjetos

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre la superficie de un portaobjetos limpio y seco, con un asa bacteriológica se transfirió una pequeña cantidad del crecimiento de una colonia a la gota del peróxido de hidrógeno y se observó para comprobar el desarrollo de burbujas de oxígeno. La interpretación de los resultados fue la siguiente manera:

- Positivo → producción de una gran cantidad de burbujas
- Negativo → ausencia de burbujas o muy escasa cantidad (ver nota¹).

Producción de coagulasa. Prueba en tubo

Se colocaron 0.5 mL de plasma en tubo limpio, en el cual se transfirió una pequeña cantidad de colonia con un asa bacteriológica y se emulsificó, se incubó a 35°C durante 4 horas, posteriormente se observó si hubo formación de un coágulo inclinando suavemente el tubo, si en este momento no se observaron coágulos, se reincubó el tubo a temperatura ambiente y se tomó lectura 18 horas después. La interpretación de los resultados fue de la siguiente manera:

- Positivo → formación de coágulo
- Negativo → no hay formación de coágulo

Producción de oxidasa. Método de Kovac

Se humedeció un papel filtro con 2-3 gotas de dihidroclorhidrato de tetra-metil-*p*-fenilendiamina al 1% y en este se colocó y extendió una colonia de no más de 24 horas, empleando un palillo de madera (ver nota²), durante los siguientes 10 segundos se observó en busca de un cambio de color. La interpretación de los resultados fue la siguiente manera:

- Positivo → desarrollo de color violeta oscuro dentro de 10 segundos
- Negativo → ausencia de color

¹ Algunos microorganismos (*Enterococcus*) producen una peroxidasa que genera un resultado débilmente positivo, esta reacción no se interpretó como un resultado positivo verdadero.

² También puede usarse un asa con alambre de platino, ya que los alambres de níquel que contienen cromo y hierro pueden dar resultados falsos positivos.

APÉNDICE B

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Acetato de sodio 3 M

Disolver 12.3 g de acetato de sodio en 300 mL de agua ultrapura. Ajustar el pH con HCl 12 F y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL

25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

Bromuro de etidio 2 µg/mL

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock más 249 mL de agua ultrapura). Debe almacenarse en la oscuridad.

EC

Disolver 29.2 g de NaCl, 1 g de deoxicolato de sodio, 2.5 g de laurilsarcosina de sodio, 2.5 g de brij 58, 5 mL de Tris-base 1 M pH 8.0 y 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0. Aforar con agua destilada a 500 mL y esterilizar.

ES

Pesar 93.1 g de EDTA y disolver en 400 mL de agua destilada, ajustar a pH 9 con \approx 20 g de NaOH, añadir 0.5 g de sarcosyl. Aforar con agua destilada a 500 mL y esterilizar.

Etanol al 70%

Mezclar 35 mL de etanol absoluto y 15 mL de agua destilada estéril.

PIV

Disolver 29.22 g de NaCl en 5 mL de Tris-base 1M pH 8. Aforar a 500 mL y esterilizar.

TBE 10X (*Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM pH 8*).

Disolver 27 g de Tris-base, 13.7g de ácido bórico, 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en agua ultrapura y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

TBE 0.5X

Medir 50 mL de TBE 10X y aforar a 1000 mL con agua destilada.

TE 1X (*Tris-HCl mM pH 8, EDTA 1 mM*).

Mezclar 500 μ L de Tris-HCl 500mM pH=8 y 50 μ L de EDTA 500mM en agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 25mL. Esterilizar en autoclave

Tris-HCl 500 mM pH=8

Disolver 30.3 g de trisma base en 300 mL de agua ultrapura. Ajustal el pH con HCl 12 F y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave